



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ :
C12N 15/12, 15/63, 15/67
C12N 15/85, C07K 13/00
A61K 37/02

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/05786

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 17. März 1994 (17.03.94)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02295

(22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1993 (26.08.93)

(30) Prioritätsdaten:
P 42 28 457.0 27. August 1992 (27.08.92) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEI-
ERSDORF AG [DE/DE]; Unnastraße 48, D-20253
Hamburg (DE). GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH-
NOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE];
Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : EICHNER, Wolfram
[DE/DE]; Dorotheenstraße 49, D-22301 Hamburg (DE).
ACHTERBERG, Volker [DE/DE]; Eimsbütteler Markt-
platz 11, D-20257 Hamburg (DE). DÖRSCHNER, Alb-
recht [DE/DE]; Schanzenstraße 107, D-20357 Hamburg
(DE). MEYER-INGOLD, Wolfgang [DE/DE]; Am Ha-
senkamp 29, D-22457 Hamburg (DE). MIELKE, Heiko
[DE/DE]; Fischbeker Straße 22, D-21629 Neu Wulm-
storf (DE). DIRKS, Wilhelm [DE/DE]; Bültenweg 13,
D-38106 Braunschweig (DE). WIRTH, Manfred [DE/

DE]; Marktstraße 1, D-38300 Wolfenbüttel (DE). HAU-
SER, Hansjörg [DE/DE]; Georg-Westermannallee 29,
D-38104 Braunschweig (DE).

(74) Anwalt: VOELKER, Ingeborg; Uexküll & Stolberg, Bese-
lerstr. 4, D-22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, HU, JP, KZ, PL, RU,
US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PRODUCTION OF HETERODIMER PDGF-AB BY MEANS OF A BICISTRONIC VECTOR SYSTEM IN MAMMALIAN CELLS

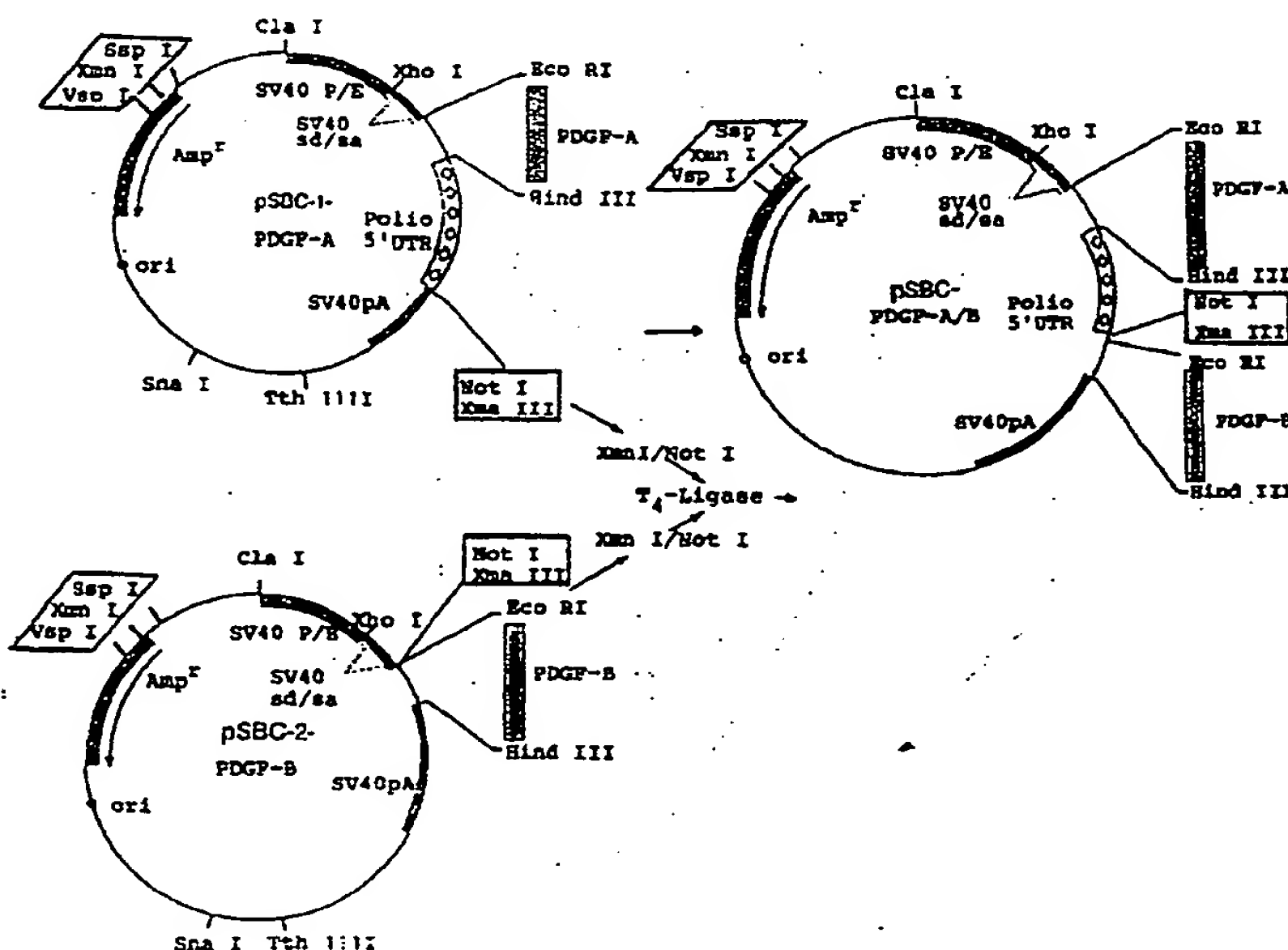
(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON HETERODIMEREM PDGF-AB MIT HILFE EINES BICISTRONISCHEN VEK-
TORSYSTEMS IN SÄUGERZELLEN

(57) Abstract

The recombinant production of PDGF-AB in mammalian cells is disclosed by means of a bicistronic vector system in which an IRES sequence is located between the first and second cistrons and in which the B chain coding gene is located in the first cistron. The disclosed expression unit allows the equimolar expression of the A and B polypeptide chains.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die rekombi-
nante Herstellung von PDGF-AB in Säuger-
zellen unter Verwendung eines bicistroni-
schen Vektorsystems, in welchem sich zwi-
schen dem ersten und dem zweiten Cistron
eine IRES-Sequenz befindet und das für die
B-Kette codierende Gen in dem ersten Ci-
stron positioniert ist. Die erfindungsgemäße
Expressionseinheit führt zu einer äquimola-
ren Expression der Polypeptidketten A und
B.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Herstellung von heterodimerem PDGF-AB mit Hilfe eines
bicistronischen Vektorsystems in Säugerzellen

Die Erfindung betrifft die rekombinante Herstellung von PDGF-AB (rPDGF-AB) in Säugerzellen als Wirtszellen, welches im wesentlichen frei ist von den homodimeren Begleitprodukten PDGF-AA und -BB .

Seit vielen Jahren ist es möglich, einzelne Proteine, deren Gene durch Klonierung isoliert wurden, nach Manipulation und Gentransfer in verschiedenen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen herzustellen. Für das Erreichen der vollen biologischen Aktivität vieler Proteine sind korrekte Faltungen, richtiges Prozessieren und gegebenenfalls auch posttranslationale Modifikationen erforderlich, welche in prokaryontischen und niederen eukaryontischen Expressionssystemen oftmals nicht korrekt ausgeführt werden. Aus diesem Grund bedient man sich häufig Säugerzellen als Wirte. Säugerzellen sind darüber hinaus in der Lage, große Mengen von Proteinen zu sekretieren.

Aus verschiedenen Gründen bedarf es oftmals der simultanen Herstellung zweier oder mehrerer Proteinketten. Zum Beispiel sind viele natürliche Proteine in ihrer funktionellen Form aus

mehreren Untereinheiten zusammengesetzt (z.B. Antikörper). Natürlichlicherweise erfolgt die Assoziation verschiedener Untereinheiten von komplexen Proteinen nach der Proteinsynthese. An dieser Assoziation sind häufig andere Komponenten des zellulären Apparates als Katalysatoren oder Kontrollelemente beteiligt, wobei es gelegentlich auch zu Umfaltungen der ursprünglichen Strukturen kommt. Störungen der Assoziation, z.B. durch ungleiche Synthese der einzelnen Komponenten, können sowohl für die zu bildenden Proteine als auch für die Wirtszelle negative Konsequenzen haben. Natürlichlicherweise unterliegt dieses System einer ausgefeilten, meist zellspezifischen Regulation. Da diese Regulation in genetisch manipulierten Zellen im allgemeinen nicht nachstellbar ist, wurden die nachfolgend erläuterten Alternativen zur simultanen Herstellung mehrerer Fremdproteine entwickelt und angewandt:

- 1) Die Gene werden getrennt in Expressionsvektoren integriert und dann in einem geeigneten Verhältnis in die Zellen cotransferiert. Dies setzt voraus, daß mehrere Plasmidkopien gleichzeitig stabil aufgenommen und bei der Teilung weitergetragen werden. Das Verhältnis der Expression der verschiedenen Gene zueinander hängt sowohl von der Kopienzahl als auch von der Integrationsstelle im Genom der Wirtszelle ab. Durch aufwendige Screeningverfahren ist es möglich, Zellklone zu isolieren, welche die einzelnen Genprodukte im gewünschten Verhältnis zueinander exprimieren.
- 2) Um die Kopienzahl zu nivellieren, werden die verschiedenen Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor plaziert. Dies sichert weitgehend die stöchiometrische Repräsentanz der Gene, aber auch dieses Verfahren ist mit Problemen behaftet. Selbst wenn nämlich Expressionseinheiten mit Promotoren gleicher Stärke verwendet werden, ist keineswegs sichergestellt, daß die mRNAs, welche für die verschiedenen Proteine kodieren, die gleiche Stabilität und Translationseffizienz aufweisen. Auch die Transkriptionseffizienz

- 3 -

beider Gene muß nicht zwangsläufig identisch sein. In diesem Fall wird mit Hilfe von gentechnischen Tricks (Positionierung der Transkriptionseinheiten zueinander, Modulation der Stärke der einzelnen Promotoren durch Wegnehmen oder Hinzufügen einzelner Elemente) die Stöchiometrie der Expression schrittweise hergestellt.

3) Zur Vermeidung der Probleme im Zusammenhang mit der Stabilität der mRNA verschiedener Transkripte wurden bi- oder multicistronische Vektoren entwickelt. Hierzu liegen die einzelnen Leseraster der die Proteinketten kodierenden Genabschnitte - Cistrons - auf einer Transkriptionseinheit (Expressionseinheit). Die Expression des multicistronischen Gens erfolgt durch einen einzigen Promotor. Bei derartigen Vektoren wird normalerweise das erste Cistron sehr effizient translatiert, die nachfolgenden aber in Abhängigkeit von den intercistronischen Sequenzen. Verwendet man für diese intercistronischen Sequenzen normale 5' nicht translatierte Sequenzen (5'UTR) aus monocistronischen Genen, so ist die Expression des nachfolgenden Cistrons meist sehr niedrig (in der Regel um 0,5 bis 2% der Translation des ersten Cistrons, Kaufman et al., 1987; Boel et al., 1987). Diese Effizienz konnte zunächst durch Einfügen von Leadersequenzen (High Efficiency Leaders, HEL) auf etwa 20% gesteigert werden. Mit der Entdeckung und Verwendung von bestimmten zellulären und viralen Sequenzen, welche eine interne Translationsinitiation ermöglichen (IRES; Jackson et al., 1990), war es möglich, ein Translationsverhältnis zwischen dem ersten und dem nachfolgenden Cistron von 3:1 zu erzielen.

30

Die Schlüsselrolle bei der Verwendung bi- oder multicistronischer Vektoren spielt die Translation. Normalerweise erfolgt die Initiation der Translation in Eukaryonten nach dem "cap"-abhängigen Mechanismus, im Verlaufe dessen ein Prä-Initiationskomplex aus Proteinen und RNA am 5'Ende einer mRNA mit "cap" (methyliertes Nukleotid) aufgebaut wird. Von dort aus wird ein geeignetes

35

Translationsinitiationskodon ausgesucht, von dem ausgehend die Translation gestartet wird. Man glaubt, daß dies über einen "Scanning"-Prozeß abläuft, wobei sich der Prä-Initiationskomplex entlang der mRNA in 3'Richtung bewegt. Auf diese Weise wird, von
5 einigen Ausnahmen abgesehen, immer das am 5'Ende liegende Cistron effizient translatiert (Kozak, 1989). Alle nachfolgenden Cistrons werden gar nicht oder sehr ineffizient translatiert. Die Translations-Effizienz der nachfolgenden Cistrons konnte durch Optimierung des Abstandes zwischen den Genen (intercistronische Regionen; Kozak, 1987; Wirth et al., 1991) oder durch
10 Verwendung von sogenannten "high efficiency leader"-Sequenzen (HEL, s.o.) verbessert werden (z.B. Falcone und Andrews, 1991 und Ref. darin). HEL's sind solche 5'nicht translatierten Bereiche von Genen oder auch anderen Sequenzen, welche die Initiation der "cap"-abhängigen Translation stimulieren. Auch bei
15 derartigen Konstrukten sind jedoch die erreichbaren Expressionswerte für das zweite und die nachfolgenden Cistrons immer deutlich geringer als die des "cap"-abhängig regulierten ersten Cistrons.

20

Ein in den letzten Jahren aufgedeckter Mechanismus zur internen Translationsinitiation benutzt spezifische Nukleinsäuresequenzen. Zu diesen Sequenzen zählen die nicht translatierten Bereiche einzelner Picorna-Viren, z.B. Polio-Virus, Encephalomyocarditis-Virus, (Pelletier und Sonenberg, 1988; Jang et al., 1988;
25 Jang et al., 1989) sowie einiger zellulärer Proteine, z.B. BiP (Macejak und Sarnow, 1991). Bei den Picorna-Viren sorgt ein kurzer Abschnitt des 5'nicht translatierten Bereichs, das sogenannte IRES (internal ribosomal entry site), für die interne Bindung eines Prä-Initiationskomplexes. Darüber hinaus sind weitere
30 Bereiche aus dieser Region für die effiziente Initiation dieser Translation notwendig. So zeigt es sich z.B., daß für eine effiziente Translation nicht nur die 400 Basenpaare stromaufwärts des IRES, sondern auch der extreme 5'Teil der Picorna-Virus
35 nicht-translatierten Region notwendig ist (Simoes und Sarnow, 1991). Auf der anderen Seite führt das "capping", die Voraus-

- 5 -

setzung für den normalen Initiationsmechanismus der Translation, zu einer Reduktion der Effizienz der internen Initiation von Polio-Virus IRES, wenn er am 5'Ende einer entsprechenden mRNA lokalisiert ist (Hambidge und Sarnow, 1991). Der negative Effekt wird aufgehoben, wenn die IRES für die Initiation des zweiten Cistrons verantwortlich ist, also zwischen "cap" und IRES ein Cistron liegt.

IRES-Elemente können also als Initiatoren für die effiziente Translation von Leserastern fungieren. Dabei beeinflussen sie die "cap"-abhängige Translation des ersten Cistrons nicht. Auch umgekehrt scheint eine Beeinflussung der IRES-abhängigen Initiation unabhängig von der "cap"-abhängigen Translationsinitiation zu sein. Die Mechanismen beider Vorgänge unterscheiden sich auch deutlich in der Verwendung verschiedener zellulärer Faktoren (Meerovitch et al., 1989; Jang und Wimmer, 1990). In der vergangenen Zeit wurden mehrere Untersuchungen publiziert, bei denen bicistronische Expressionsplasmide verwendet wurden (Adam et al., 1991; Ghattas et al., 1991; Kaufman et al., 1991; Wood et al., 1991; Wirth et al., 1991). Da aber offensichtlich die "cap"-abhängige Translation stärker ist als die IRES-abhängige Translation, konnte eine stöchiometrische Expression zweier Proteinketten nicht erreicht werden. Die bisherigen Verwendungen konzentrierten sich deshalb auf die Verwendung von Selektionsmarkern im zweiten Cistron. Die enge Expressionskoppelung des Selektionsmarkers mit dem zu exprimierenden Gen, welches das erste Cistron darstellt, ist besonders vorteilhaft bei der Selektion auf Hochexpression, insbesondere, wenn eine vorausgehende Genamplifikation erforderlich ist.

30

Die Synthese äquimolarer Proteinmengen von bi- oder multicistronischen Expressionsvektoren ist jedoch bisher nicht erreicht worden. Die äquimolare Expression zweier verschiedener Proteinketten ist für die rekombinante Herstellung des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen, "Platelet-Derived-Growth-Factor" (PDGF), einem der Hauptmitogene im menschlichen Blutserum, von besonde-

35

rer Bedeutung. Aus menschlichen Thrombozyten aufgereinigtes PDGF besteht aus zwei unterschiedlichen, aber nahe verwandten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Unter reduzierenden Bedingungen zerfällt das dimere PDGF
5 in seine monomeren Untereinheiten, wovon die größere (M_r 15-17.000 D) als PDGF-A-Kette und die kleinere (M_r 14.000 D) als PDGF-B-Kette bezeichnet wurde (Johnsson et al., 1984).

Die Proteinketten PDGF-A und -B werden von verschiedenen Genen
10 kodiert. Die vollständige Struktur beider Genprodukte konnte durch cDNA-Klonierung aufgeklärt werden (Ratner et al., 1985, Betsholtz et al., 1986). Dabei zeigte es sich, daß beide PDGF-Moleküle zunächst als ungewöhnlich lange Vorläufermoleküle, sog. Precursoren, synthetisiert und anschließend intrazellulär zu den
15 reifen PDGF-Ketten prozessiert werden. Durch alternatives Spleißen lassen sich zwei verschiedene PDGF-A-Transkripte erklären, die sich durch An- oder Abwesenheit eines 69-bp Segmentes im 3'-Bereich unterscheiden (Betsholtz et al., 1986; Wise et al., 1989). Durch dieses Insert kommt es zu einer Änderung im codie-
20 renden Abschnitt mit der Folge, daß eine kurze (PDGF-A_K, 110 Aminosäuren) und eine lange (PDGF-A_L, 125 Aminosäuren) Form der PDGF-A-Kette gebildet wird. Beide Varianten sind als normale zelluläre Proteine nebeneinander nachweisbar, wobei die kürzere Form die häufigere Spezies ist (Matoskova et al., 1989; Young et
25 al., 1990).

Beide Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und zeigen einen hohen Homologiegrad. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt, daß beide Gene unterschiedlichen Regulationsmechanismen
30 unterliegen. Eine Folge davon ist, daß beide PDGF-Ketten natürlicherweise in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichem Verhältnis zueinander produziert werden.

Alle drei möglichen Isoformen des PDGF (AA, AB und BB) kommen
35 natürlicherweise vor und sind in Thrombozyten in sogenannten α -Granula gespeichert. Aus überlagerten menschlichen Blutplätt-

chen kann neben dem die Hauptmenge bildenden PDGF-AB Heterodimer auch PDGF-BB zu etwa 30 % isoliert werden (Hammacher et al., 1988). Frisch präparierte Blutplättchen enthalten auch einen hohen Anteil (27%) an PDGF-AA (Hart et al., 1990). Es kann daher
5 angenommen werden, daß in den Vorläuferzellen der Thrombozyten, den Megakaryozyten, der Anteil beider Homodimere zusammen etwa dem AB-Heterodimer-Anteil entspricht. Da die Konzentration jeder PDGF-Spezies im Thrombozyten direkt korrelieren sollte mit ihrer individuellen Bedeutung im Wundheilungsgeschehen, kommt insbe-
10 sondere der häufigsten Isoform, dem PDGF-AB, eine herausragende Bedeutung auf der Suche nach einem "Wundheilungshormon" zu.

Jede der verschiedenen Isoformen besitzt biologische Aktivität *in vitro*. Erst die Verfügbarkeit der hochreinen, rekombinanten
15 PDGF-Isoformen (Hoppe et al., 1989; Hoppe et al., 1990) machte vergleichende Studien zur Differenzierung der unterschiedlichen Wirkungsspektren der verschiedenen PDGF-Spezies möglich. Inzwischen belegen eine Reihe von Untersuchungen die unterschiedliche Potenz von PDGF-AA, AB und BB im Chemotaxis- und DNA-Prolifera-
20 tionstest (Hosang et al., 1989; Nister et al., 1988; Reilly & Broski, 1989; Siegbahn et al., 1990), sowie deren unterschiedlichen Einfluß auf die Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat, Produktion von Diacylglycerol und $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung (Block et al., 1989; Sachinidis et al., 1990 A, 1990 B). Zwei
25 unterschiedliche PDGF-Rezeptorpopulationen, von denen der PDGF- α -Rezeptor alle PDGF-Isoformen und der β -Rezeptor nur PDGF-BB bindet (Hart et al., 1988; Heldin et al., 1988) liefern eine plausible Erklärung dafür, wie sich Wirkungsunterschiede der PDGF-Isoformen über deren unterschiedliche Potenz zur Rezep-
30 toraktivierung entfalten können. Die meßbaren unterschiedlichen *in vitro*-Effekte der PDGF-Isoformen, zusammen mit dem Nachweis zweier verschiedenener Rezeptorpopulationen, lassen Rückschlüsse auf unterschiedliche *in vivo* Wirkungsspektren von PDGF-AA, AB und BB zu. Daher ist die Produktion von reinem PDGF-AB, ohne
35 PDGF-BB oder PDGF-AA als Begleitproteine, wünschenswert. Um ein homogenes, gut charakterisiertes Heterodimer zu erhalten, müßten

die Homodimere sonst durch Reinigung vollständig eliminiert werden, was durch die sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften aller PDGF Spezies zusätzlich erschwert wird.

- 5 Eine Reihe verschiedener Wege zur Herstellung von rekombinanten PDGF-Homodimeren, insbesondere PDGF-BB, sind zum Teil schon seit längerer Zeit bekannt (Kelly et al., 1985; Heldin et al., 1986; Hoppe et al., 1989; Beckmann et al., 1988; Bywater et al., 1988; Stroobant & Waterfield 1984). Ein Herstellungsverfahren für
- 10 hochreines PDGF-AB wurde von Hoppe et al. (1990, s.a. PCT/EP 90/00 063) beschrieben. Hier werden die getrennt in unterschiedlichen E.coli-Zellen hergestellten, inaktiven Monomere durch in vitro-Renaturierung in biologisch aktives PDGF-AB überführt.
- 15 Die bislang synthetisierten Genprodukte der drei PDGF-Isoformen weisen, trotz variierender Länge der A- bzw. B-Einzelstränge, weitgehend übereinstimmende biologische Aktivität auf.
- Für die heterologe Expression von PDGF-AB Heterodimeren in eukaryontischen Systemen gelten die eingangs erwähnten Kriterien der
- 20 simultanen Expression zweier (oder mehrerer) Proteine. Die bisher publizierten Strategien zur Herstellung von PDGF-AB in rekombinanten CHO-Zellen (Östman et al., 1988) und mit Hilfe von Hefe-Expressionssystemen [EP 0 259 632] entsprechen dem oben
- 25 unter 2) erläuterten Fallbeispiel, wo sich beide PDGF-Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor befinden. Die Quantifizierung der auf diese Weise in CHO-Zellen exprimierten unterschiedlichen PDGF-Dimere ergab 19% für PDGF-AA, 69% für PDGF-AB und 12% für PDGF-BB (Östman et al., 1988).
- 30 Eine Grundvoraussetzung für die bevorzugte Synthese von PDGF-AB Heterodimeren mit Hilfe eukaryontischer Expressionssysteme ist daher nicht nur in der stöchiometrischen Repräsentanz beider Gene, sondern in erster Linie auch in deren koordinierter Expression zu sehen. Daher bieten sich bicistronische Expressions-
- 35 einheiten als mögliche Hilfsmittel für die Expression heterodi-

- 9 -

merer Proteine und damit des PDGF-AB an. In WO 90/01550 wird ein derartiges System auch für die Expression von PDGF beschrieben. Wie unter Punkt 3) oben näher erläutert, liefern diese Konstrukte jedoch nur sehr limitierte Expressionsraten für das zweite
5 (und nachfolgende) Cistron. Abhängig von der im ersten Cistron lokalisierten PDGF-Kette werden vorwiegend Homodimere dieses Typs gebildet. Bisher in der Literatur beschriebene Versuche, beide PDGF-Gene mit Hilfe anderer Expressionssysteme in einer eukaryontischen Zelle zu exprimieren, führten zu Homodimer-Ne-
10 benproduktanteilen im Bereich von 30% oder mehr. Um dennoch mit diesen Zellsystemen PDGF-AB zu erhalten, müssen aufwendige und extrem verlustreiche Reinigungstechniken angewendet werden.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Expressionssystem zu
15 schaffen, mit Hilfe dessen PDGF-AB ohne wesentliche Verunreinigung durch die jeweiligen Homopolymere hergestellt werden kann.

Erfindungsgemäß konnte die Aufgabe durch die Verwendung eines Konstrukts gelöst werden, welches in an sich bekannter Weise von
20 der IRES-Sequenz zwischen dem ersten und zweiten Cistron Gebrauch macht, jedoch das für PDGF-B kodierende Gen in das erste Cistron einbringt. Überraschenderweise hat es sich erfindungsgemäß gezeigt, daß die Wirtszellen nach Transfektion mit diesen Konstrukten PDGF-AB ohne nennenswerten Anteil an Homodi-
25 meren sezernieren. Ausbeute und Wirtschaftlichkeit der nachgeschalteten Proteinreinigungsverfahren wird dadurch beträchtlich verbessert.

Gegenstand der Erfindung ist demgemäß eine bicistronische Ex-
30 pressionseinheit zur rekombinanten Herstellung von heterodimerem PDGF-AB in Säugerzellen als Wirtszellen, welche gekennzeichnet ist durch die allgemeine Formel

p - 5'UTR - C₁ - IRES - C₂ - 3'UTR - polyA,

- 10 -

in der

31

p ein transkriptionaler Promotor ist,

5 5'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

C₁ ein Cistron ist, welches ein für die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

10

IRES eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

15

C₂ ein Cistron ist, welches ein für die A-Kette von PDGF oder ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

20

3'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz,

und polyA ein Polyadenylierungssignal ist,

25

wobei C₁, IRES und C₂ operativ miteinander verknüpft sind.

Als Promotoren kommen alle diejenigen Promotoren in Betracht, die in eukaryontischen Zellen wirksam sind, d. h., die die Genexpression in eukaryontischen Zellen initiieren können. Insbesondere können alle konstitutiven und induzierbaren Promotoren viralen (beispielsweise die "Long terminal repeats, LTR's, von Retroviren oder Herpes Simplex Thymidin-Kinase Promotor), zellulären (beispielsweise Interferon- oder Ubiquitin-Promotor) oder synthetischen Ursprungs verwendet werden. Erfindungsgemäß ist der SV40-Promotor bevorzugt.

30

35

Die 5'UTR und die 3'UTR sind beliebige, in der Regel nichttranslatierte Nukleotidsequenzen, die regulierende Elemente enthalten können. Erfindungsgemäß geeignet sind beispielsweise die Sequenzen aus SV-40 nach Artelt et al. (1988).

5

Das erste Cistron, C_1 , kann die vollständige PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), deren Analoga und jegliches Fragment enthalten, welches für eine biologisch wirksame PDGF-B Kette kodiert. Insbesondere kommen in diesem Zusammenhang das zur PDGF-B-Kette homologe *v-sis*-Gen (Produkt des Simian Sarcoma Virus (SSV)) sowie die Basenpaare 283 bis 609 gemäß SEQ ID Nr. 3 in Betracht, welche die reife PDGF-B Kette kodieren.

Analog kann das zweite Cistron, C_2 , die lange oder kurze PDGF-A Vorläufersequenz (PDGF-A_L oder PDGF-A_K - SEQ ID Nr. 1) sowie jegliche Fragmente enthalten, welche für eine biologisch aktive PDGF-A Kette kodieren. In Betracht kommt insbesondere das Fragment gemäß den Basenpaaren 353 bis 682 gemäß SEQ ID Nr. 1, welches für die reife PDGF-A Kette kodiert.

20

Als IRES können alle diejenigen Sequenzen viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs verwendet werden, welche eine interne Bindung der Ribosomen vermitteln. Beispiele für derartige Sequenzen sind die IRES aus Poliovirus Typ 1 gemäß SEQ ID Nr. 5, welche die ersten 628 Nukleotide der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 einschließt, sowie ferner die 5'UTR des Enzephalomyocarditis Virus (EMV), des "Theilers murine encephalomyelitis virus" (TMEV), des "foot and mouth disease virus" (FMDV), des "bovine enterovirus" (BEV), des "coxsackie B virus" (CBV), des "human rhinovirus" (HRV) und die "human immunoglobulin heavy chain binding protein" (BIP) 5'UTR, die *Drosophila Antennapediae* 5'UTR, die *Drosophila Ultrabithorax* 5'UTR oder genetische Hybride oder Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen. Erfindungsgemäß bevorzugt ist die IRES aus Poliovirus Typ 1 gemäß SEQ ID Nr. 5.

35

Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinante DNA Vektoren, welche die erfindungsgemäße Expressionseinheit enthalten. Ein erfindungsgemäß bevorzugter Vektor ist in Figur 4B und dessen Herstellung in den Figuren 1 bis 3 dargestellt.

5

Die Erfindung schließt ferner Wirtszellen ein, welche Säugerzellen sind und mit einem Vektor transformiert sind, der die erfindungsgemäße Expressionseinheit trägt. Vorzugsweise handelt es sich um CHO- oder BHK-Zellen, wobei letztere besonders bevorzugt sind. Eine erfindungsgemäß transformierte BHK-Zelle wurde unter der Bezeichnung 91-21-4D am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegt. Ihr wurde die Hinterlegungsnummer DSM ACC2045 zugeteilt.

15 Die Erfindung schließt darüber hinaus Verfahren zur Herstellung von heterodimerem rPDGF-AB ein, in deren Verlauf Säugerzellen als Wirtszellen, welche die erfindungsgemäße Expressionseinheit operativ insertiert enthalten, in einem geeigneten Medium kultiviert werden und das so erzeugte rPDGF-AB von den Zellen und dem
20 Medium abgetrennt wird. Als Medium kommen alle bekannten Medien zum Kultivieren von Säugerzellen in Betracht, einschließlich synthetischer, proteinfreier oder proteinarmer Produktionsmedien. Erfindungsgemäß wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), angereichert mit 4,5 g/l Glukose und 5 bis 10 % FCS,
25 bevorzugt.

Das rPDGF-AB wird nach herkömmlichen Verfahren (vgl. beispielsweise Östmann et al. 1988) von den Zellen und dem Medium abgetrennt. Vorzugsweise wird erfindungsgemäß ein für PDGF-AA entwickeltes und hoch effizientes Verfahren (Eichner et al., 1989)
30 angewendet.

Gegenstand der Erfindung ist schließlich heterodimeres rPDGF-AB, welches im wesentlichen frei ist von homodimeren Begleitprodukten und welches erhältlich ist durch Kultivieren der oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Wirtszellen. Überraschenderweise
35

- 13 -

hat es sich gezeigt, daß die mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt transformierten Wirtszellen das heterodimere PDGF-AB mit einer Reinheit von 90% und mehr, bezogen auf die Gesamtmenge des gebildeten PDGF, sezernieren. Erfindungsgemäß bevorzugt ist PDGF-AB, welches durch Kultivieren von BHK-Zellen, transformiert mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt, beispielsweise derjenigen Zellen, welche unter der Bezeichnung 91-21-4D am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) hinterlegt wurden (Hinterlegungsnummer DSM ACC2045), zugänglich ist.

Das erfindungsgemäße rPDGF-AB unterscheidet sich von den bisher bekannten rekombinanten PDGF-AB Produkten in erster Linie durch seinen hohen Reinheitsgrad. Wie eingangs ausgeführt, ist bisher kein rekombinantes Verfahren beschrieben worden, bei dem 90% und mehr des erhaltenen Produktes aus dem Heterodimeren besteht. Da die vollständige Abtrennung der Homodimeren von dem Heterodimeren nahezu unmöglich ist, sind die bekannten Produkte zwangsläufig Gemische aus allen 3 Isoformen.

20

Darüberhinaus haften den bekannten Produkten, abhängig von deren Herstellung, in mehrfacher Hinsicht Nachteile an. So ist es bekannt, daß die heterologe Genexpression in Hefezellen, wie in EP 259 632 oder 288 307 beschrieben, zu Proteinprodukten mit gegenüber dem humanen Produkt veränderten Glykosylierungsmustern führt. Zudem ist in Hefezellen exprimiertes PDGF-B zumindest teilweise unvollständig prozessiert und/oder proteolytisch abgebaut (vgl. WO 912/01716). Derartige Produkte weisen somit ein verändertes Kohlenhydratmuster auf und sie sind mit proteolytischen Abbauprodukten verunreinigt. Zur Vermeidung der vorgenannten Nachteile beschreibt die WO 92/01716 Verfahren zur Herstellung modifizierter PDGF-Ketten, bei denen die Konsensus-Sequenzen für die Glykosylierung bzw. die Protease sensitiven Domänen entfernt sind. Derartige Modifikationen beeinflussen jedoch die biologische Aktivität des Produktes (vgl. WO 92/01716).

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch Kultivieren von erfindungsgemäß transformierten BHK-Zellen, und insbesondere durch Kultivieren der Wirtszellen 91-21-4D mit der Hinterlegungs-Nr.: DSM ACC2045 heterodimeres
5 rPDGF-AB gewonnen.

Ferner ist aus der WO 90/08163 die rekombinante Herstellung von PDGF-AB in Bakterienzellen, insbesondere in *E. coli* bekannt, welche zwangsläufig zu einem nicht glykosylierten Produkt führt.
10 Eine nach diesem Verfahren in *E. coli* Zellen exprimierte PDGF-B-Kette ist jedoch aminoterminal um 12 Aminosäuren verkürzt. Darüberhinaus muß das Produkt aus Bakterien *in vitro* renaturiert werden, ein Vorgang, bei dem die korrekte inter- und intramolekulare Bildung der Disulphidbrücken und die korrekte Faltung des
15 Proteins nicht gewährleistet ist mit der Folge, daß die immunologischen Eigenschaften des Produkts verändert und die biologische Aktivität beeinflußt werden können.

Das heterodimere rPDGF-AB gemäß der Erfindung wird vorzugsweise
20 zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen als pharmazeutisches Präparat, insbesondere für die Wundheilung formuliert. In diesem Zusammenhang kann es als Wirkstoff in Pflastern, Wundverbänden und dergleichen enthalten sein. Es ist besonders für die topische Verabreichung geeignet, es kommen
25 jedoch auch Applikationen in Betracht, in deren Verlauf der Wirkstoff in die Wunde eingebracht oder subkutan verabreicht wird. Beispielsweise kann das PDGF-AB in einer geeigneten Matrix mit Depotfunktion im Wundrandbereich subkutan appliziert werden oder direkt subkutan injiziert werden.

30 Ferner eignet sich das erfindungsgemäße rPDGF-AB zur Herstellung von kosmetischen Präparaten, zum Beispiel zur Hautregeneration, zur Hautglättung, zur Verhinderung der Narbenbildung oder der Hautalterung sowie zur Anwendung bei Sonnenbrand.

- 15 -

Geeignete Hilfs- und Trägerstoffe schließen Cellulose-Gele auf wässriger Basis, biologisch abbaubare Polymere sowie jegliche Salben- und Cremebasis und Sprays ein. Ferner können zusätzliche Wirkstoffe, welche die Wundheilung beeinflussen, wie beispielsweise Kollagen, Fibronectin, Faktor XIII, Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF, bFGF), Transformierender Wachstumsfaktor Typ α oder β , Epidermis Wachstumsfaktor, Insulin oder "Insulin-like Growth Factor" (IGF I, II) oder weitere Wachstumsfaktoren in den erfindungsgemäßen Präparaten enthalten sein. Die erfindungsgemäßen Produkte können beispielsweise auch in Wundverbänden in wässriger Lösung vorliegen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert:

1. Beschreibung der Figuren:

Fig. 1) Schematische Darstellung der Herstellung der Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2.

Fig. 2) Vektor M13BCL1; in der Vektorkarte ist der c-sis (PDGF-B) homologe Bereich aus pMVW-2 angegeben. Der Bereich des reifen PDGF-B und der NcoI/SalI (SEQ ID Nr. 8 + 9) Adapter sind durch schwarze Balken hervorgehoben.

Fig. 3) Schematische Darstellung der Rekonstruktion der vollständigen PDGF-B-Vorläufersequenz.

Fig. 4A +B) Schematische Darstellung der Konstruktion des bicistronischen Vergleichs-Vektors pSBC-A/B (Fig. 4A) und des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSBC-PDGF-B/A (Fig. 4B) aus den Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2. Die Expressionsvektoren pSBC-PDGF-A/B und pSBC-PDGF-B/A unterscheiden sich dabei durch die Orientierung der kodierenden cDNA-Sequenzen der PDGF-A- und -B-Kette, d.h. durch ihre Lokalisierung auf dem Plasmid als in Lese-richtung erstes bzw. zweites Cistron.

Fig. 5) Northern-Blot Analyse transformierter BHK-Zellen. Es wurde die mRNA aus dem Gesamtpool der BHK-Zellen untersucht, die stabil mit den monocistronischen bzw. bicistronischen PDGF-Expressionskonstrukten transfiziert worden waren. Erwartungsgemäß zeigen die monocistronischen mRNAs eine Größe von etwa 1.300 nt, während bei den bicistronischen mRNAs die Größe der codierenden Sequenzen beider PDGF-Ketten (2.500 Nucleotide) vorhanden ist. Hiermit ist gezeigt, daß die entsprechenden Genprodukte von einer einzigen bicistronischen mRNA abgelesen werden. Als Referenz wurde die murine α -Actin Probe verwendet [Minty, A.J. et al., J. Biol. Chem. 256, 1008 - 1014, (1981)].

- 17 -

- Fig. 6) Sandwich-ELISA zum Nachweis von PDGF-AB mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpers: Eichkurven von PDGF-Standards.
- Polystyrolplatten wurden mit Schaf-Anti-Maus-IgG beschichtet und anschließend mit einem Maus-Hybridoma-Überstand (von Klon 1B3, enthält monoklonale Antikörper gegen die B-Kette in PDGF-AB und -BB) inkubiert; nach Inkubation mit verschiedenen PDGF Standards wurde das gebundene PDGF mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Anti-PDGF-AA, gefolgt von Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen;
- Quelle der PDGF-Standards:
- AB: aus humanen Thrombozyten, von PROMEGA Corp. No. G 5161;
- BB: rekombinant aus Hefe, von PROMEGA Corp. No. G 5191;
- AA: rekombinant aus BHK-Zellen, ca. 70%^{ig} (Eichner et al., 1989).
- Für PDGF's aus eukaryontischen Quellen ergibt sich ein spezifisches Signal mit PDGF-AB (aus humanen Thrombozyten) mit einer geringen Kreuzreaktion mit PDGF-BB.
- Fig. 7) Nachweis von PDGF-AB in Kulturüberständen von rekombinanten BHK-Zellen mittels PDGF-AB-ELISA: (Eichkurven von Standards s. Fig. 6). Die dargestellten Proben stammten von BHK-Zellen, die mit folgenden Vektorkonstrukten transfiziert worden waren:
- Probe: Nr.1: pSBC-A/B,
Nr.2: pSBC-B/A,
Nr.3: pSBC-2-PDGF-A +pSBC-2-PDGF-B,
Nr.4: pSBC-2-PDGF-A,
Nr.5: pSBC-2-PDGF-B,
Nr.6: pSBC-2-Kontrolle

Fig. 8) Analyse von gereinigtem rPDGF über SDS-PAGE. Die Proben wurden auf einem 13,5%igen Polyacrylamidgel in der Gegenwart von SDS aufgetrennt und anschließend mit Coomassieblau gefärbt.

5

1, 6, 11 = LMW (PHARMACIA) [14400, 20100, 30000, 43000, 67000, 94000 D]

2 = pSBC-B/A

3 = pSBC-2-PDGF-A + pSBC-2-PDGF-B

10

4 = pSBC-A/B

5 = pSBC-2-PDGF-A

7-10 = gleiche Auftragsreihenfolge wie 2-5, unter Zugabe von jeweils 10% (v/v) β -Mercaptoethanol (10 min, 95°C)

15

Die Analyse der gereinigten Sekretionsprodukte über SDS-PAGE korreliert mit den Ergebnissen aus der Analyse der Kulturüberstände (Tab. 2). Insbesondere an den unter reduzierenden Bedingungen auftretenden Banden der PDGF-Monomere kann man gut erkennen, daß Transfektionszellpools der Konstellation pSBC-2PDGF-A + pSBC-2-PDGF-B (Cotransfer) und pSBC-A/B (PDGF-A-Kette im ersten Cistron) überwiegend PDGF-AA-Homodimere sekretieren.

20

25

Das aus pSBC-B/A-Kulturüberständen isolierbare PDGF bandiert gegenüber dem als Referenz aufgetragenen PDGF-AA bei einem geringfügig niedrigeren Molekulargewicht. Unter reduzierenden Bedingungen lassen sich beide Monomere zu etwa gleichen Teilen nachweisen. Die oberen Banden korrespondieren mit den Monomer-Banden der PDGF-A-Kette. Für rekombinantes PDGF-AA aus BHK-Zellen wurde bereits gezeigt, daß dieses Material zu etwa gleichen Anteilen aus der vollständigen PDGF-A-Kette, sowie einer C-terminal verkürzten Spezies besteht (Eichner et al., 1989).

30

- 19 -

Die monomeren PDGF-A-Ketten bandieren bei einer M_r von etwa 17 KD. Darunter bandiert die PDGF-B-Kette (M_r 16 KD), die bei dem aus pSBC-B/A-Überständen isolierten Material ebenfalls in einer verkürzten Form auftritt. Die Subspezies beider Ketten wurden gemeinsam durch Proteinsequenzanalyse analysiert und eindeutig als PDGF-A und PDGF-B identifiziert. Molekulargewichtsunterschiede für PDGF-B sind daher, genau wie bei PDGF-A, möglicherweise auf C-terminale Verkürzungen oder veränderte Glycosylierungsmuster zurückzuführen. PDGF aus Überständen von pSBC-B/A besteht demnach zu etwa gleichen Teilen aus PDGF-A und PDGF-B-Ketten.

Das als Referenz aufgetragene, ebenfalls in BHK-Zellen exprimierte PDGF-AA ist nicht glykosyliert (Eichner et al., 1989), während in CHO-Zellen exprimiertes PDGF einen Kohlenhydratanteil von etwa 7% enthält (Kolvenbach et al., 1991). Die PDGF-A-Monomere sowohl aus dem PDGF-AA-Homodimer als auch aus dem AB-Heterodimer stimmen in ihrem Laufverhalten in der SDS-PAGE gut überein.

- 20 -

2. Expression von PDGF-AB Heterodimer mit Hilfe des bicistronischen Vektorsystems

2.1 Herstellung der Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2 (Fig.1)

Für die Konstruktion des Vektors pSBC-1 wurde ein 627 bp MseI/BalI-Fragment aus dem Plasmid pGEM3-5' Polio (M) (Sarnow, 1989) als Matrize für eine PCR mit folgenden Primern verwendet:

5'-Polio1 5' TTT CTGCAG AAGCTT AAAACAGCTCTGGGG^{3'}
PstI HindIII

(SEQ ID Nr. 13)

3'-Polio2 5' TT GCGGCCGC AATCCAATTCGCTTTATG^{3'}
NotI

(SEQ ID Nr. 14)

Das nach der Amplifikation erhaltene 652 bp Fragment wurde mit Pol I K behandelt, anschließend mit PstI gespalten und in den entsprechend präparierten Vektor pBEH (Artelt et al., 1988) insertiert.

Für die Konstruktion des Vektors pSBC-2 wurde das Plasmid pBEH mit Eco RI linearisiert und die folgenden Oligonukleotidsequenzen hybridisiert und insertiert:

E-N-E1 5' AATT GCGGCCGC G^{3'} (SEQ ID Nr. 15)

E-N-E2 3' CGCCGGCG CTTAA^{5'} (SEQ ID Nr. 16)

2.2 Rekonstitution der vollständigen PDGF-B-Vorläufersequenz

Das Plasmid pMVW-2 enthält die cDNA des humanen PDGF-B Gens, welches im 5'-translatierten Bereich der Vorläufersequenz unvollständig ist (Weich et al., 1986). Für die Rekonstitution des authentischen PDGF-B precursors wurde in den 5'-terminalen Bereich des Vorläufers durch einen C-T-Austausch

- 21 -

in Position 30 des codogenen Abschnittes des Klons pMVW-2 eine BclI-Schnittstelle eingeführt. Durch diesen Schritt geht letztlich nur ein kurzer Abschnitt des kodierenden Bereiches verloren und die lokal codierte Aminosäure (Asparaginsäure) bleibt dabei erhalten. Da die BclI-Schnittstelle in den meisten *E.coli*-Stämmen durch Methylierung resistent gegenüber enzymatischer Spaltung ist, muß das diese Schnittstelle enthaltene Fragment entweder in einen *dam*⁻-Stamm umkloniert, oder über einen PCR-Schritt amplifiziert werden. Der fehlende Bereich des Vorläufers wird dann als synthetisches SalI/BclI-Fragment [Oligomere PPDGFB1 und PPDGFB2 (SEQ ID Nr. 11 + 12)] eingesetzt.

Hierfür wurde zunächst das 914 bp BamHI/NcoI-Fragment aus pMVW-2 über einen synthetischen Adapter [Oligomere NCCLSA1 und NCCLSA2 (SEQ ID Nr. 8 + 9)] in den BamHI/SalI-gespaltenen Bakteriophagen M13mp19 (Pharmacia) insertiert. Dieses Konstrukt lieferte die notwendige Einzelstrang-DNA für den nachgeschalteten *in vitro* Mutageneseschritt, der mit Hilfe des Oligomer-directed *in vitro* mutagenesis system (Version 2) der Fa. Amersham, basierend auf der Methode von Eckstein et al. [Taylor J. W., Ott J. and Eckstein F. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 8764-8785; Nakamaye K. and Eckstein F. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 9679-9698; Sayers J. R., Schmidt W. and Eckstein F. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 791-802] durchgeführt wurde. Durch den synthetischen Primer [PDGBBCL (SEQ ID Nr. 10)] wird nach der Mutagenese ein Basenaustausch (C zu T) in Position 144 der unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz erreicht und dadurch im 5'-Bereich des PDGF-B precursors eine BclI-Schnittstelle eingeführt. Dieses Mutagenesederivat wurde als M13BCL1 bezeichnet (Fig. 2).

Ein 1100 bp Fragment aus M13BCL1 wurde über einen PCR-Schritt mit Hilfe der Primer M1317MER und M1324MER (SEQ ID Nr. 6 + 7) amplifiziert, anschließend einer BclI/HindIII-Restriktion unterworfen und das resultierende 770 bp Frag-

ment isoliert. Die synthetischen Oligomere PPDGFB1 und PPDGFB2 (SEQ ID Nr. 11 + 12) bilden den fehlenden 5'-Bereich des PDGF-B-Vorläufers bis zur BclI-Schnittstelle. Nach dem Annealing wurde dieses doppelsträngige Oligomer anschließend, zusammen mit dem 770 bp PDGF-B Fragment, in den mit einer SalI/HindIII Restriktion vorbereiteten Vektor pGEM-2 (Promega) ligiert (Fig. 3). Die authentische Sequenz von PDGF-B wurde durch vollständige Sequenzierung verifiziert.

2.3 Konstruktion der bicistronischen Expressionsvektoren pSBC-PDGF-A/B und pSBC-PDGF-B/A für die PDGF-A- und B-Kette (Fig. 4A und B)

Die vollständige codierende cDNA für den PDGF-B precursor (Ratner et al., 1985) liegt in dem Vektor pGEM2-PDGF-B vor, wie unter 1.2 beschrieben. Die vollständige cDNA-Sequenz der kurzen Variante der PDGF-A-Kette (Betsholtz et al., 1986) ist im Expressionsvektor pODA (Eichner et al., 1989) enthalten. Dieser Vektor wurde erhalten durch Klonierung des RsaI-Fragments aus pPGF-1 (Hoppe et al., 1987) in den SV-40 Expressionsvektor pBEH (Artelt et al., 1988).

Die kodierenden cDNA-Sequenzen der PDGF-A- und -B-Kette wurden unter Verwendung von EcoRI/HindIII Restriktionen in die monocistronischen Vektoren pSBC-1 und -2 insertiert (Abb. 4). Die Fusion beider Vektoren zu einer bicistronischen Expressionseinheit wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme XmnI/NotI durchgeführt.

2.4 Herstellung transformierter BHK-Zellen

Die Transfektion der mono- und bicistronischen Expressionsvektoren, die die codierenden Sequenzen der A- und B-Kette von PDGF tragen (vgl. Fig.1, 4A+B) wurde mit der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik in BHK-Zellen durchgeführt (Wigler et al., 1979; Graham & van der Eb, 1973). Einen Tag

vor der Transfektion wurden $2-3 \times 10^5$ BHK-Zellen/24 cm² in neue Kulturflaschen umgesetzt. Vier Stunden vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel mit DME-Medium durchgeführt. 5 µg der o. g. Plasmid-DNA zusammen mit 0,5 µg der Selektionsplasmide pAG60 und pSVpac (Colbère-Garapin, 1981; Vara et al., 1986), welche für ein Neomycinresistenzgen bzw. für eine Puromycin-Resistenz kodieren, in 250 µl 250 mM CaCl₂ suspendiert. Die Lösung wurde langsam unter ständiger Verwirbelung durch steril eingeblasene Luft zu 250 µl 2 x HEPES-Puffer (280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM NaH₂PO₄ pH 7,1) gegeben und das erhaltene Präzipitat dem Nährmedium zugesetzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde durch Medienwechsel von DME- auf Doppelselektionsmedium (5 µg/ml Puromycin; 500 µg/ml G418, Wirth et al., 1988) die Selektion auf stabil transfizierte Zellen begonnen und eine Population von PDGF sekretierenden Zellklonen erhalten. Ein repräsentatives Klongemisch dieser Zellen wurde bei der DSM am 11. 8. 1992 unter der Nummer DSM ACC2045 hinterlegt.

20 2.5 Northern Blot Analyse

Polyadenylierte RNA aus transformierten BHK-Zellen wurde nach Purchio et al., (1979) isoliert, über ein 1%iges Agarose-Formaldehydgel fraktioniert (Lehrach et al., 1977), auf eine Nylonmembran geblottet und mit [³²P]-markierten PDGF-A- und -B-Ketten spezifischen Sonden hybridisiert (Fig. 5).

30 2.6 Gewinnung konditionierter Zellkulturüberstände

Die Transformation der BHK-Zellen erfolgte analog 2.4. Nach dem Auszählen der Kolonien wurden die Zellen abtrypsinisiert, in frischem Selektionsmedium aufgenommen und auf eine Zellzahl von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 10 ml dieser Zellsuspension wurden in eine Flasche mit 65 cm² Bodenfläche überführt und für weitere 48 h kultiviert. Danach wurde das

Medium entfernt und durch 10 ml Produktionsmedium (DMEM, ohne Serum und Selektions-Antibiotika) ersetzt. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch serumhaltiges Selektionsmedium ersetzt. Die geernteten Überstände wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Zum Zeitpunkt der Ernte betrug die Zellzahl/Flasche $0.8-1.2 \times 10^7$.

2.7 Nachweis von PDGF in den Kulturüberständen mit Hilfe des Mitogentests

Die Messung der Stimulierung der DNA-Syntheserate von dichtearretierten Fibroblasten erlaubt eine Bestimmung der mitogenen Aktivität des PDGF. Eine Unterscheidung zwischen den Isoformen ist dabei nicht möglich.

Der Assay wurde gemäß Shipley et al. (1984) mit AKR-2B-Mausfibroblasten in 24-Well-Platten durchgeführt. Reines PDGF zeigt in dem Test eine halbmaximale Stimulierung bei einer Konzentration von etwa 5 ng/ml. Dieser Wert wurde benutzt, um Produktivitäten zu bestimmen. Die Ergebnisse aus dem Mitogentest sind in Fig. 7 den Werten aus dem PDGF-AB-ELISA gegenübergestellt.

2.8 Nachweis von PDGF-AB Heterodimer in den Kulturüberständen mit Hilfe eines spezifischen PDGF-AB ELISA's

Es wurde ein 'two-antibody sandwich assay' aufgebaut, der eine spezifische Quantifizierung von PDGF-AB neben PDGF-AA und -BB erlaubt.

Sandwich-Assay mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyclonalen Anti-PDGF-Antikörpers:

Polystyrolplatten mit 96 Kavitäten (Fa. Dynatech, U-Platte, No. M124B) werden in folgender Reihenfolge beschichtet

- 25 -

(zwischen jedem Schritt jeweils 4 x Waschen mit PBS mit 0,05% Tween 20):

- 5 1) Schaf-Anti-Maus-IgG (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 1097 105), 3 µg/ml.
- 2) 1% BSA (Fa. E. Merck, Nr. 12018) in PBS, pH 7,5, 100 µl für 1 h bei R.T.
- 10 3) Maus-Hybridoma-Überstand von Klon 1B3 [erhalten durch Fusion von SP2/0-Myelomzellen mit Milzzellen von Mäusen, die mit rekomb. PDGF-AB (aus *E. coli* gemäß Hoppe et al. (1990) immunisiert worden waren], 2 µg/ml IgG2a/ml. Der monoklonale Antikörper bindet spezifisch an der B-Kette von PDGF-Dimeren.
- 15 4) PDGF-haltige Lösungen, verdünnt in PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20 (PBS+), 50 µl für 1 h bei R.T.
- 20 5) Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-AA-IgG (Fa. Genzyme, No. ZP-214, bindet an der A-Kette von dimerem PDGF), 2 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T.
- 25 6) POD-markiertes Ziege-Anti-Kaninchen IgG (Fa. Pierce, No. 31460), 0,1 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T., Detektion mit dem Substrat Tetramethylbenzidin gemäß E.S. BOS et al. (J.Immunoassay 2 (1981), 187-204).

2.8.1 Ergebnisse:

30

In der Abbildung 7 sind die Resultate von drei unterschiedlichen Analysen für PDGF aus Kulturüberständen rekombinanter BHK-Zellen dargestellt.

35

Der Mitogentest liefert einen brauchbaren Wert für die Gesamtmenge des in den Kulturüberständen vorhandenen

- 26 -

rPDGF, ohne zwischen den verschiedenen Isoformen (PDGF-AA, AB oder BB) differenzieren zu können.

5 Der spezifische Anteil an heterodimerem PDGF-AB kann mit ausreichend hoher Genauigkeit durch den PDGF-AB-spezifischen ELISA bestimmt werden. Aus der Differenz dieser Analyse zum Ergebnis des Mitogentests kann der prozentuale Anteil von PDGF-Homodimeren rechnerisch ermittelt werden (Tabelle 1).

10 Das Ergebnis des ELISA's zeigt, daß nur in Kulturüberständen von transfizierten Zelllinien des Typs pSBC-PDGF-B/A die meßbare biologische Aktivität im Mitogentest mit hohen PDGF-AB-Werten korreliert.

15

2.9 Reinigung des sekretierten PDGF-AB

20 Für die Reinigung der Sekretionsprodukte aus 1,5 - 2,5 Litern konditionierter Kulturüberstände der unterschiedlichen Transfektions-Zellpools wurde ein für die Reinigung von rPDGF-AA aus Zellkulturüberständen entwickeltes Verfahren angewendet (Eichner et al., 1989). Das nach dem HPLC-Schritt hoch- oder teilgereinigte PDGF wurde auf einem Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) in der Gegenwart von SDS aufgetrennt und nach anschließender Coomassieblaufärbung analysiert (Fig. 8).

25

2.10 Aminoterminaler Sequenzierung von PDGF-Polypeptiden

30 Durch Proteinsequenzanalyse sollten beide PDGF-Ketten eindeutig identifiziert werden um auszuschließen, daß hier verkürzte, prozessierte Formen nur einer PDGF-Kette vorliegen (s. Fig. 8).

35

Die automatische Sequenzanalyse wurde am Modell 477A (Applied Biosystems) mit dem Zyklus BLOTT1 durchgeführt. Die

- 27 -

Analyse der Phenylthiohydantoin-Aminosäuren-Derivate erfolgte auf dem online gekoppelten 120A PTH-Analyser.

5 Die Disulfidbrücken der Probe werden mit Dithiothreitol reduziert und mit 4-Vinylpyridin alkyliert. Sie wird auf einem horizontalen SDS-Elektrophorese-Gel nach Schagger und von Jagow, modifiziert wie beschrieben (Westermeyer et al. SD 092/89, Pharmacia LKB Biotechnologie) getrennt. Die Probe wird auf eine PVDF-Membran (Problot, Applied Biosystems) mit 10 einem diskontinuierlichen Puffersystem wie beschrieben (Westermeyer et al. SDRE-072, Pharmacia LKB Biotechnologie) geblottet und mit Comassie Brilliant Blau R250 gefärbt. Die beiden Doppelbanden bei 17 und 16 KD werden ausgeschnitten und zusammen sequenziert.

15 Nach den Ergebnissen der Proteinbestimmung wurden 10 µg Probe analysiert. Es konnten die N-terminalen Aminosäuren der PDGF-A- und PDGF-B-Kette in gleicher Ausbeute nachgewiesen werden (Tabelle 2). Nebensequenzen wurden nicht detek- 20 tiert.

Tabelle 1

	pSBC-A/B	pSBC-B/A	pSBC-2-PDGF-A + pSBC-2-PDGF-B	pSBC-2-PDGF-A	pSBC-2-PDGF-B	pSBC-Kontrolle
PDGF [ng/ml] (Mitogentest)	600	550	900	1000	250	0
PDGF-AB [ng/ml] (PDGF-AB-ELISA)	240	520	600	30	10	10
Anteil PDGF-AB	40	95	56	3	4	0

Tabelle 2

Aminosäuresequenzanalyse der PDGF-A- und PDGF-B-Kette

Zyklus	PDGF-A		PDGF-B	
	Code	Ausbeute (pmol)	Code	Ausbeute (pmol)
1	Ser	101,1*	Ser	
2	Ile	75,7	Leu	89,7
3	Glu	58,8	Gly	82,0
4	Glu	67,2	Ser	42,9
5	Ala	55,7	Leu	70,2
6	Val	61,0	Thr	59,4
7	Pro	45,9	Ile	65,4
8	Ala	104,6*	Ala	
9	Val	46,8	Glu	49,9
10	Cys	40,5	Pro	31,8
11	Lys	24,1	Ala	34,6
12	Thr	23,5	Met	16,5
13	Arg	30,3	Ile	25,2
14	Thr	24,7	Ala	29,2
15	Val	17,5	Glu	28,6
16	Ile	27,5	Cys	23,2
17	Tyr	16,4	Lys	11,2
18	Glu	20,9	Thr	13,4
19	Ile	24,8	Arg	20,9
20	Pro	17,1	Thr	16,9
21	Arg	29,0	Glu	16,7
22			Val	19,8
23	Gln	8,1	Phe	10,2

* Ausbeute aus beiden Ketten

Abkürzungen:

BHK	- Hamsterzelllinie (Baby Hamster Kidney)
bp	- Basenpaar(e)
CHO	- Hamsterzelllinie (Chinese Hamster Ovary)
BSA	- Rinderserumalbumin
D	- Dalton
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay
HEPES	- 4-(2-Hydroxyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	- Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IgG	- Immunglobulin der Klasse G
IRES	- internal ribosomal entry site
nt	- Nukleotid(e)
PAGE	- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	- phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	- Polymerase Kettenreaktion
PDGF	- Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
POD	- Peroxidase
PVDF	- Polyvinylidenfluorid
SDS	- Natriumdodecylsulfat
UTR	- nicht translatierte Region

LITERATUR

Adam M. A., Ramesh N., Miller A. D., and Osborne W. R. A. (1991) J. Virol. 65, 4985-4990.

Artelt P., Morelle C., Ausmeier M., Fitzek M., and Hauser H. (1988) Gene 68, 213-219.

Beckmann M. P., Betsholtz C., Heldin C.-H., Westermarck B., Di Marco E., Di Fiore P. P., Robbins K. C., and Aaronson S. A. (1988) Science 241, 1344-1349.

Betsholtz C., Johnsson A., Heldin C.-H., Westermarck B., Lind P., Urdea M. S., Eddy R., Shows T. B., Philpott K., Mellor A. L., Knott T. J., and Scott J. (1986) Nature 320, 695-699.

Block L. H., Emmons L. R., Vogt E., Sachinidis A., Vetter W., and Hoppe J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2388-2392.

Boel E., Berkner K. L., Nexoe B. A., and Schwartz T. W. (1987) FEBS Lett. 219, 181-188.

Bywater M., Rorsman F., Bongcam-Rudloff E., Mark G., Hammacher A., Heldin C.-H., Westermarck B., and Betsholtz C. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2753-2762.

Colbère-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky P., and Garapin A. C. (1981) J. Mol. Biol. 150, 1-14.

Eichner W., Jäger V., Herbst D., Hauser H. and Hoppe J. (1989) Eur. J. Biochem. 185, 135-140.

Falcone D., and Andrews D.W. (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (5), 2656-2664.

Ghattas I. R., Sanes J. R., and Majors J. E. (1991) Mol. Cell. Biol. 22, 5848-5859.

Graham F., and van der Eb L. (1973) Virology 52, 456-487.

Hambidge S. J., and Sarnow P. (1991) J. Virol. 65, 6312-6315.

Hammacher A., Hellmann U., Johnsson A., Östman A., Gunnarsson K., Westermarck B., Wasteson Å., and Heldin C.-H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16493-16499.

Hart C. E., Forstrom J. W., Kelly J. D., Seifert R. A., Smith R. A., Ross R., Murray M. J., and Bowen-Pope D. F. (1988) Science 240, 1529-1531.

Hart C. E., Bail y M., Curtis D. A., Osborn S., Raines E., Ross R., and Forstrom J. W. (1990) Biochemistry 29, 166-172.

- 32 -

- Heldin C.-H., Johnsson A., Wennergren S., Wernstedt C., Betsholtz C., and Westermark B. (1986) *Nature* 319, 511-514.
- Heldin C.-H., Bäckström G., Östman A., Hammacher A., Rönnstrand L., Rubin K., Nister M., and Westermark B. (1988) *EMBO J.* 7, 1387-1393.
- Hoppe J., Schumacher L., Eichner W. and Weich H.A. (1987), *FEBS Lett.* 223, 243-246.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W. (1989) *Biochemistry* 28, 2956-2960.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W., and Tatje D. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 207-214.
- Hosang M., Rouge M., Wipf B., Eggiman B., Kaufmann F., and Hunziker W. (1989) *J. Cell. Physiol.* 149, 558-564.
- Jackson R. J., Howell M. T., and Kaminski A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 477-483.
- Jang S. K., Kräusslich H., Nicklin M. J. H., Duke G. M., Palmenberg A. C., and Wimmer E. (1988) *J. Virol.* 62, 2636.
- Jang S. K., Davies M. V., Kaufmann R. J., and Wimmer E. (1989) *J. Virol.* 63 (4), 1651-1660.
- Jang S. K., and Wimmer E. (1990) *Genes Dev.* 4, 1560-1572.
- Johnsson A., Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., Deuel T. F., Huang J. S., Seeburg P. H., Gray A., Ullrich A., Scrace G., Stroobant P., Waterfield M. D. (1984) *EMBO J.* 136, 921-928.
- Kaufman R. J., Murtha P., and Davies M. V. (1987) *EMBO J.* 6, 187-193.
- Kaufman R. J., Davies M. V. Wasley L. C., and Michnick D. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490.
- Kelly J. D., Raines E. W., Ross R., and Murray M. J. (1985) *EMBO J.* 4, 3399-3405.
- Kolvenbach C. G., Langley K. E., Strickland T. W., Kenney W. C., and Arakawa T. (1991) *J. Biochem. Biophys. Meth.* 23, 295-300.
- Kozak M. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7 (10), 3438-3445.
- Kozak M. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 5134-5142.
- Laemmli U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., and Boedtker H. (1977) *Biochemistry* 16, 4743-4751.

- Macejak D. G., and Sarnow P. (1991) *Nature* (London) 353, 90-94.
- Matoskova B., Rorsman F., Svensson V. and Betsholtz C. (1989), *Mol. Cell. Biol.* 9, 3148-3150.
- Meerovitch K., Pelletier J., and Sonenberg N. (1989) *Genes Dev.* 3, 1026-1034.
- Nister M., Hammacher A., Mellström K., Siegbahn A., Rönnerstrang L., Westermark B., and Heldin C.-H. (1988); *Cell* 52, 791-799.
- Östman A., Rall L., Hammacher A., Wormstead M. A., Coit D., Valenzuela P., Betsholtz C., Westermark B., and Heldin C.-H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16202-16208.
- Pelletier J., and Sonenberg N. (1988) *Nature* 334, 320.
- Purchio A. F. and Fareed G. C. (1979) *J. Virol.* 29, 763-769.
- Ratner L., Josephs S. F., Jarrett R., Reitz M. S. and Wong-Staal F. (1985), *Nucl. Acids Res.* 13, 5007-5018.
- Reilly C. F. and Broski J. E. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 1047-1054.
- Sachinidis A., Locher R., Vetter W., Tatje D., and Hoppe J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10238-10243.
- Sachinidis A., Locher R., Hoppe J., and Vetter W. (1990) *FEBS Lett.* 275, 95-98.
- Sarnow P. (1989) *J. Virol.* 63, 467-470.
- Shipley G. D., Childes C. B., Volkenant M. E. and Moses H. L. (1984) *Cancer Res.* 44, 710-716.
- Siegbahn A., Hammacher A., Westermark B., and Heldin C.-H. (1990) *J. Clin. Invest.* 85, 916-920.
- Simoes E. A. F., and Sarnow P. (1991) *J. Virol.* 65, 913-921.
- Stroobant P., and Waterfield M. D. (1984) *EMBO J.* 3, 2963-2967.
- Vara J., Portela A., Oritin J. and Jimenez A. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4617-4624.
- Weich H. A., Sebald W., Schairer H. U., and Hoppe J. (1986), *FEBS Lett.* 198, 344-348.
- Wigler M., Sweet R., Sim G. K., Wold B., P llicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., and Axel R. (1979) *Cell* 16, 777-785.
- Wirth M., Bode J., Zettlmeißl G., and Hauser H. (1988) *Gene* 73, 419-426.

- 34 -

Wirth M., Schumacher L., and Hauser H. (1991) In Modern Approaches to Animal Cell Technology, Griffiths B., Spier R., and Meigner R., eds. Butterworths), pp. 338-343.

Wise R. J., Orkin S. H. and Collins T. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 6591-6601.

Wood C. R., Morris G. E., Alderman E. M., Fouser L., and Kaufman R. J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8006-8010.

Young R. M., Mendoza A. E., Collins T. and Orkin S. H. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 6051-6054.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Beiersdorf AG
(B) STRASSE: Unnastr. 48
(C) ORT: Hamburg
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 20245

(A) NAME: GBF - Gesellschaft fuer Biotechnologische
Forschung mbH
(B) STRASSE: Mascheroder Weg 1
(C) ORT: Braunschweig
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 38124

(ii) ANMELDETITEL: Herstellung von heterodimerem PDGF-AB mit
Hilfe eines bicistronischen Vektorsystems in Saeugerzellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 16

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 748 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pODA (Eichner et al., 1989)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LÄGE: 95..682
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-A Vorlaeuffersequenz
(kurze Spliceform)"
/note= "humanes PDGF-A Gen (kurze Spliceform, [2])
aus pODA, flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII
Restriktionsschnittstellen"
/citation= ([2])

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LÄGE: 353..682
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-A Kette"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

(A) AUTOREN: Eichner, W.

Jaeger, V.

Herbst, D.

Hauser, H.

Hoppe, J.

(C) ZEITSCHRIFT: Eur. J. Biochem.

(D) BAND: 185

(F) SEITEN: 135-140

(G) DATUM: 1989

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

(A) AUTOREN: Hoppe, J.

Schumacher, L.

Eichner, W.

Weich, H. A.

(C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.

(D) BAND: 223

(F) SEITEN: 243-246

(G) DATUM: 1987

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCCAC TGAATTTTCGC CGCCACAGGA GACCGGCTGG AGCGCCCGCC CCGCGCCTCG	60
CCTCTCCTCC GAGCAGCCAG CGCCTCGGGA CGCG ATG AGG ACC TTG GCT TGC	112
Met Arg Thr Leu Ala Cys	
-86 -85	
CTG CTG CTC CTC GGC TGC GGA TAC CTC GCC CAT GTT CTG GCC GAG GAA	160
Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala Glu Glu	
-80 -75 -70 -65	
GCC GAG ATC CCC CGC GAG GTG ATC GAG AGG CTG GCC CGC AGT CAG ATC	208
Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser Gln Ile	
-60 -55 -50	
CAC AGC ATC CGG GAC CTC CAG CGA CTC CTG GAG ATA GAC TCC GTA GGG	256
His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val Gly	
-45 -40 -35	
AGT GAG GAT TCT TTG GAC ACC AGC CTG AGA GCT CAC GGG GTC CAC GCC	304
Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val His Ala	
-30 -25 -20	
ACT AAG CAT GTG CCC GAG AAG CGG CCC CTG CCC ATT CGG AGG AAG AGA	352
Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg Lys Arg	
-15 -10 -5	
AGC ATC GAG GAA GCT GTC CCC GCT GTC TGC AAG ACC AGG ACG GTC ATT	400
Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile	
1 5 10 15	
TAC GAG ATT CCT CGG AGT CAG GTC GAC CCC ACG TCC GCC AAC TTC CTG	448
Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu	
20 25 30	
ATC TGG CCC CCG TGC GTG GAG GTG AAA CGC TGC ACC GGC TGC TGC AAC	496
Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn	
35 40 45	
ACG AGC AGT GTC AAG TGC CAG CCC TCC CGC GTC CAC CAC CGC AGC GTC	544
Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val	
50 55 60	

- 37 -

AAG GTG GCC AAG GTG GAA TAC GTC AGG AAG AAG CCA AAA TTA AAA GAA	592
Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu	
65 70 75 80	
GTC CAG GTG AGG TTA GAG GAG CAT TTG GAG TGC GCC TGC GCG ACC ACA	640
Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr Thr	
85 90 95	
AGC CTG AAT CCG GAT TAT CGG GAA GAG GAC ACG GAT GTG AGG	682
Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg	
100 105 110	
TGAGGATGAG CCGCAGCCCT TTCCTGGGAC ATGGATGTGG GGATCCGTCG ACCTGCAGCC	742
AAGCTT	748

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 196 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala	
-86 -85 -80 -75	
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg	
-70 -65 -60 -55	
Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu	
-50 -45 -40	
Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg	
-35 -30 -25	
Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu	
-20 -15 -10	
Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys	
-5 1 5 10	
Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro	
15 20 25	
Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg	
30 35 40	
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg	
45 50 55	
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys	
60 65 70	
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu	
75 80 85 90	

- 38 -

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
 95 100 105
 Thr Asp Val Arg
 110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 868 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (B) CLON: pMVW-2 (Weich et al., 1986)
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LÄNGE: 40..762
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-B
 Vorläufersequenz"
 /note= "humanes PDGF-B Gen aus pGEM2-PDGF-B,
 flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII
 Restriktionsschnittstellen"
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 - (B) LÄNGE: 283..609
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"
- (x) VERÖFFENTLICHUNGSIONFORMATION:
 - (A) AUTOREN: Weich, H. A.
 Sebal, W.
 Schairer, H. U.
 Hoppe, U.
 - (C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.
 - (D) BAND: 198
 - (F) SEITEN: 344-348
 - (G) DATUM: 1986

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACACC ATG AAT CGC TGC TGG	54
Met Asn Arg Cys Trp	
-81 -80	
CGG CTC TTC CTG TCT CTC TGC TGC TAC CTG CGT CTG GTC AGC GCC GAG	102
Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu	
-75 -70 -65	
GGG GAC CCC ATT CCC GAG GAG CTT TAT GAG ATG CTG AGT GAT CAC TCG	150
Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser	
-60 -55 -50 -45	

[illegible]

- 40 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 241 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear-

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

[illegible]

- 41 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 628 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Poliovirus Typ 1 (Mahoney strain)

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pGEM3-5'Polio (M) (4708 bp), (Sarnow, 1989)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..628
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "abgebildet sind die ersten 628 nt der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 (Mahoney)"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 610
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "nicht-authentische Sequenz auf Grund einer Basenpaarsubstitution von C nach G an der Position 610"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Sarnow, P.
- (C) ZEITSCHRIFT: J. Virol.
- (D) BAND: 63
- (F) SEITEN: 467-470
- (G) DATUM: 1989

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TTAAAACAGC TCTGGGGTTG TACCCACCCC AGAGGCCAC GTGGCGGCTA GTACTCCGGT	60
ATTGCGGTAC CCTTGACGC CTGTTTATA CTCCCTTCCC GTAACCTAGA CGCACAAAAC	120
CAAGTTCAAT AGAAGGGGGT ACAAACCAGT ACCACCACGA ACAAGCACTT CTGTTTCCCC	180
GGTGATGTCG TATAGACTGC TTGCGTGGTT GAAAGCGACG GATCCGTTAT CCGCTTATGT	240
ACTTCGAGAA GCCCAGTACC ACCTCGGAAT CTTGATGCG TTGCGCTCAG CACTCAACCC	300
CAGAGTGTAG CTTAGGCTGA TGAGTCTGGA CATCCCTCAC CGGTGACGGT GGTCCAGGCT	360
GCGTTGGCGG CCTACCTATG GCTAACGCCA TGGGACGCTA GTTGTTGAACA AGGTGTGAAG	420
AGCCTATTGA GCTACATAAG AATCCTCCGG CCCCTGAATG CGGCTAATCC CAACCTCGGA	480
GCAGGTGGTC ACAAACCAGT GATTGGCCTG TCGTAACGCG CAAGTCCGTG GCGGAACCGA	540
CTACTTTGGG TGTCCGTGTT TCCTTTTATT TTATTGTGGC TGCTTATGGT GACAATCACA	600
GATTGTTATG ATAAAGCGAA TTGGATTG	628

- 42 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..17
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1317MER
/note= "synthetische DNA; M13 Sequenzierprimer
(New England Biolabs GmbH), eingesetzt fuer PCR"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..24
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1324MER
/note= "synthetische DNA; M13 reverser
Sequenzierprimer (New England Biolabs GmbH),
eingesetzt fuer PCR"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AGCGGATAAC AATTCACAC AGGA

24

- 43 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..19
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA1
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Umklonierung des verkürzten PDGF-B Vorläufers
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mp19"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CATGGCCCAA TCGATCCCG

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..19
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA2
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Umklonierung des verkürzten PDGF-B Vorläufers
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mp19"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCGACGGGAT CGATTGGGC

19

- 44 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..37
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGBBCL
/note= "synthetische DNA; Mutageneseprimer zur
Einführung einer BclI-Schnittstelle in den
5'-Bereich des PDGF-B Vorläufers"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCTTTATGAG ATGCTGAGTG ATCACTCGAT CCGCTCC

37

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB1
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Rekonstitution der maturen PDGF-B
Vorläufersequenz"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

TCGACACCAT GAATCGCTGC TGGGCGCTCT TCCTGTCTCT CTGCTGCTAC CTGCGTCTGG
TCAGCGCCGA GGGGGACCCC ATTCCCGAGG AGCTTTATGA GATGCTGAGT

60

110

- 45 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB2
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur
Rekonstitution der maturen PDGF-B
Vorläufersequenz"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GATCACTCAG CATCTCATAA AGCTCCTCGG GAATGGGGTC CCCCTCGGCG CTGACCAGAC	60
GCAGGTAGCA GCAGAGAGAC AGGAAGAGCG CCCAGCAGCG ATTCATGGTG	110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..30
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 5'-POLIO1
/note= "synthetische DNA; synthetischer
PCR-Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TTTCTGCAGA AGCTTAAAC AGCTCTGGGG	30
---------------------------------	----

- 46 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 1..28
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 3'-POLIO2
/note= "synthetische DNA; synthetischer
PCR-Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TTGCGGCCGC AATCCAATTC GCTTTATC

28

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 1..13
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E1
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AATTGCGGCC GCG

13

- 47 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..13
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E2
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

AATTCGCGGC CGC

13

- 48 -

Patentansprüche

1. Bicistronische Expressionseinheit zur rekombinanten Herstellung von heterodimerem PDGF-AB in Säugerzellen als Wirtszellen, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel

$$p - 5'UTR - C_1 - IRES - C_2 - 3'UTR - polyA,$$

in der

p ein transkriptionaler Promotor ist,

5'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

C₁ ein Cistron ist, welches ein für die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

IRES eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

C₂ ein Cistron ist, welches ein für die A-Kette von PDGF oder ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

3'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

und polyA ein Polyadenylierungssignal ist,

wobei C₁, IRES und C₂ operativ miteinander verknüpft sind.

- 49 -

2. Expressionseinheit nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ die vollständige PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), deren allelische Varianten oder Fragmente derselben enthält, welche für eine biologisch wirksame PDGF-B Kette kodiert.
3. Expressionseinheit nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₁ das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder die Basenpaare 283 bis 609 gemäß SEQ ID Nr. 3 enthält.
4. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß C₂ die PDGF-A_K- (SEQ ID Nr. 1) oder die PDGF-A_L Vorläufer-Sequenz enthält.
5. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß IRES die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 5 ist.
6. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß IRES die 5'UTR des Enzephalomyocarditis Virus (EMV), des "Theilers murine encephalomyelitis virus" (TMEV), des "foot and mouth disease virus" (FMDV), des "bovine enterovirus" (BEV), des "coxsackie B virus" (CBV), des "human rhinovirus" (HRV) oder die "human immunoglobulin heavy chain binding protein" (BIP) 5'UTR, die Drosophila Antennapediae 5'UTR, die Drosophila Ultrabithorax 5'UTR oder genetische Hybride oder Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen ist.
7. Rekombinanter DNA-Vektor, welcher die Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6, operativ verknüpft mit Expressionskontrollsequenzen, enthält.
8. Wirtszelle, welche eine Säugerzelle transformiert mit dem Vektor gemäß Anspruch 7 ist.

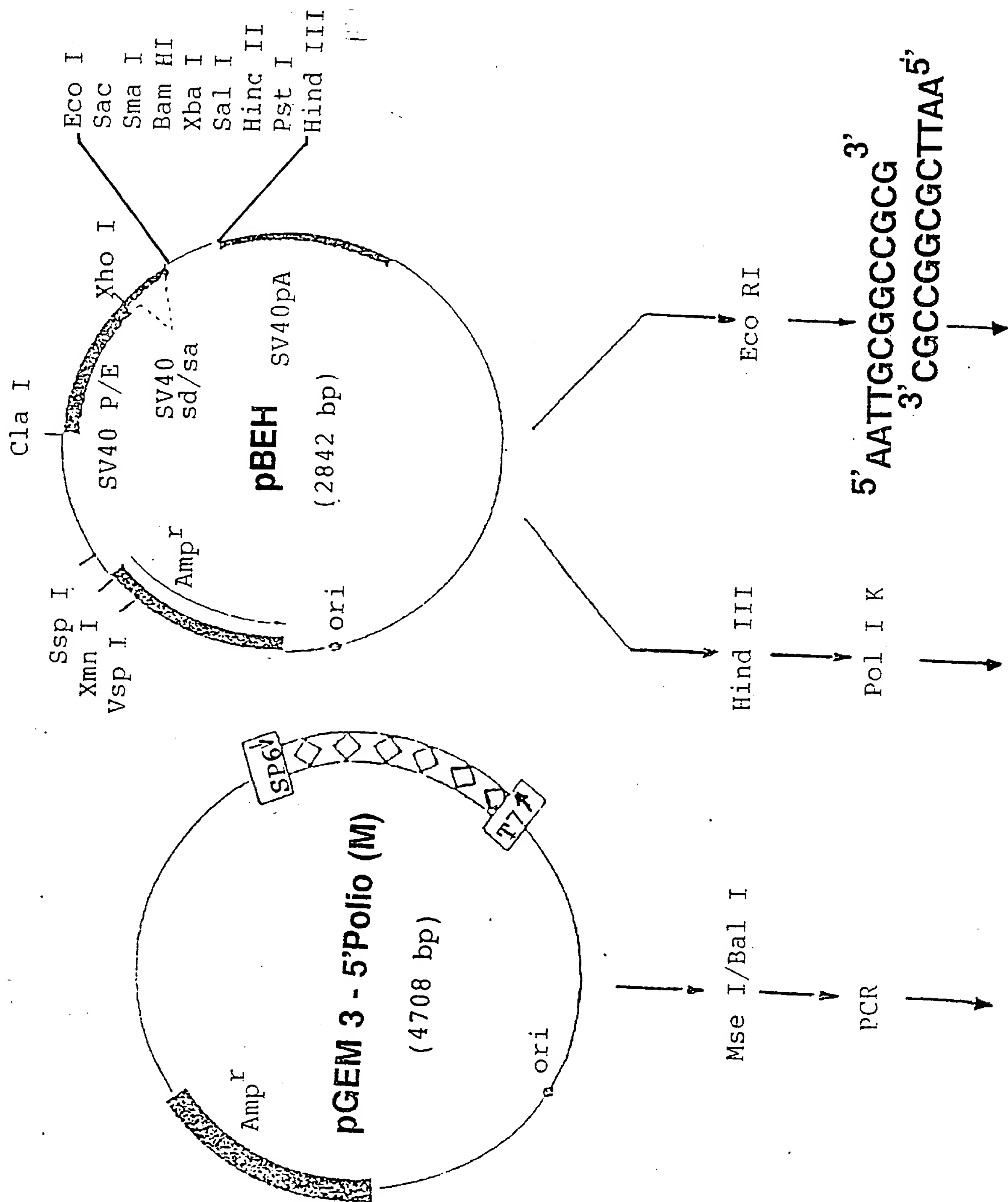
- 50 -

9. Wirtszelle nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine CHO- oder BHK-Zelle ist.
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine BHK-Zelle ist und von dem Klon 91-24-4D mit der Hinterlegungs-Nr. DSM ACC2045 abstammt.
11. Verfahren zur Herstellung von heterodimerem rPDGF-AB, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Säugerzellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ insertiert enthalten, in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium abtrennt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Wirtszelle eine Zelle nach den Ansprüchen 9 bis 11 ist.
13. Heterodimeres rPDGF-AB, im wesentlichen frei von homodimeren Begleitprodukten, **erhältlich durch** Kultivieren von Säugerzellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.
14. Heterodimeres rPDGF-AB, im wesentlichen frei von homodimeren Begleitprodukten, **erhältlich durch** Kultivieren von BHK- oder CHO-Zellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.

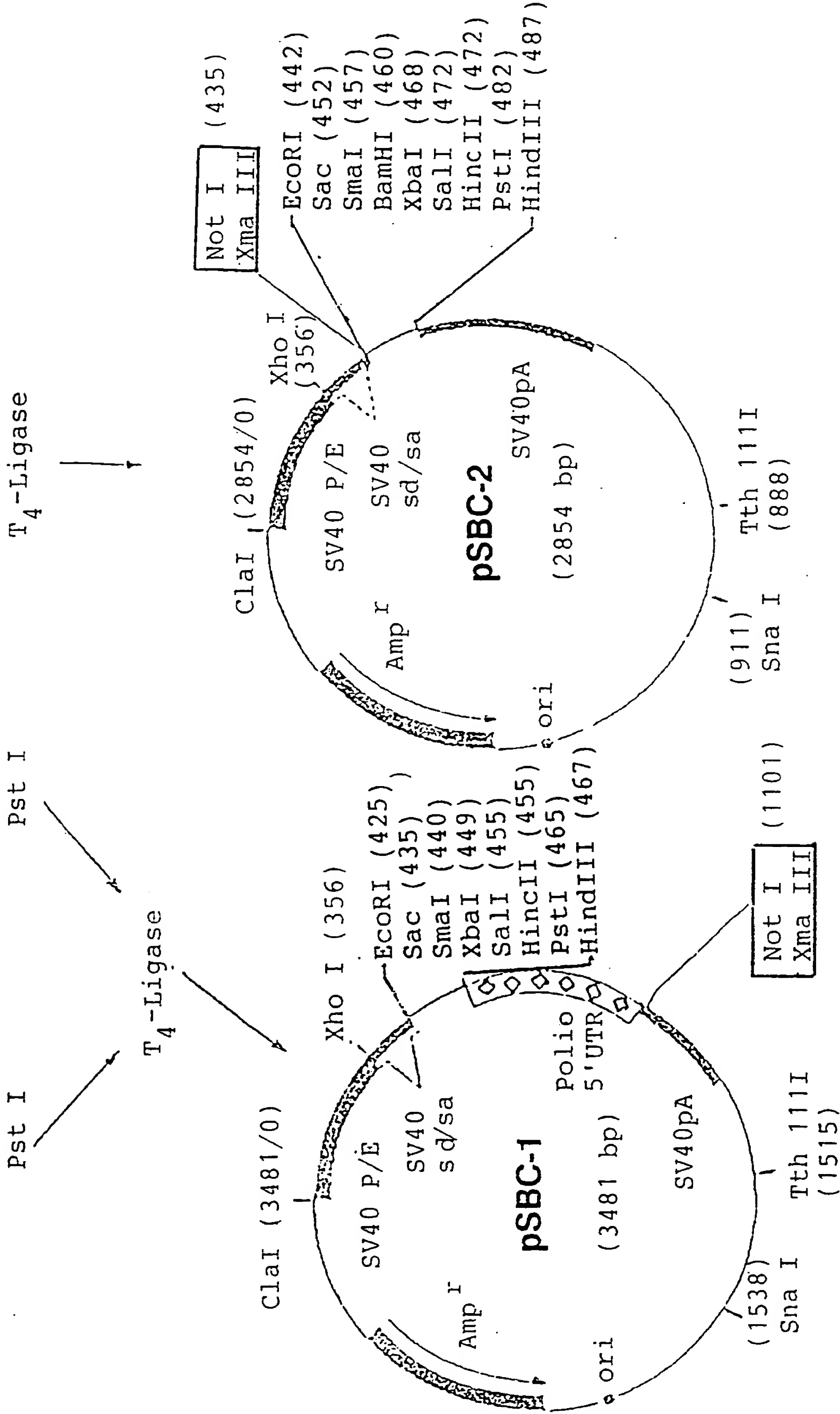
- 51 -

15. Heterodimeres, im wesentlichen von homodimeren Begleitprodukten freies PDGF-AB, erhältlich durch Kultivieren von Wirtszellen gemäß Anspruch 10, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.
16. Pharmazeutisches und/oder kosmetisches Präparat, enthaltend rPDGF-AB hergestellt nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 oder 12 zusammen mit pharmazeutisch und/oder kosmetisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen.
17. Pharmazeutisches und/oder kosmetisches Präparat, enthaltend rPDGF-AB nach den Ansprüchen 13 bis 15 zusammen mit pharmazeutisch und/oder kosmetisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen.
18. Pharmazeutisches Präparat nach den Ansprüchen 16 oder 17 in Form einer Salbe, eines Gels, eines Sprays, eines Pflasters, eines Wundverbandes oder einer Wundauflage.

Figur 1a (Fortsetzung Figur 1b) →

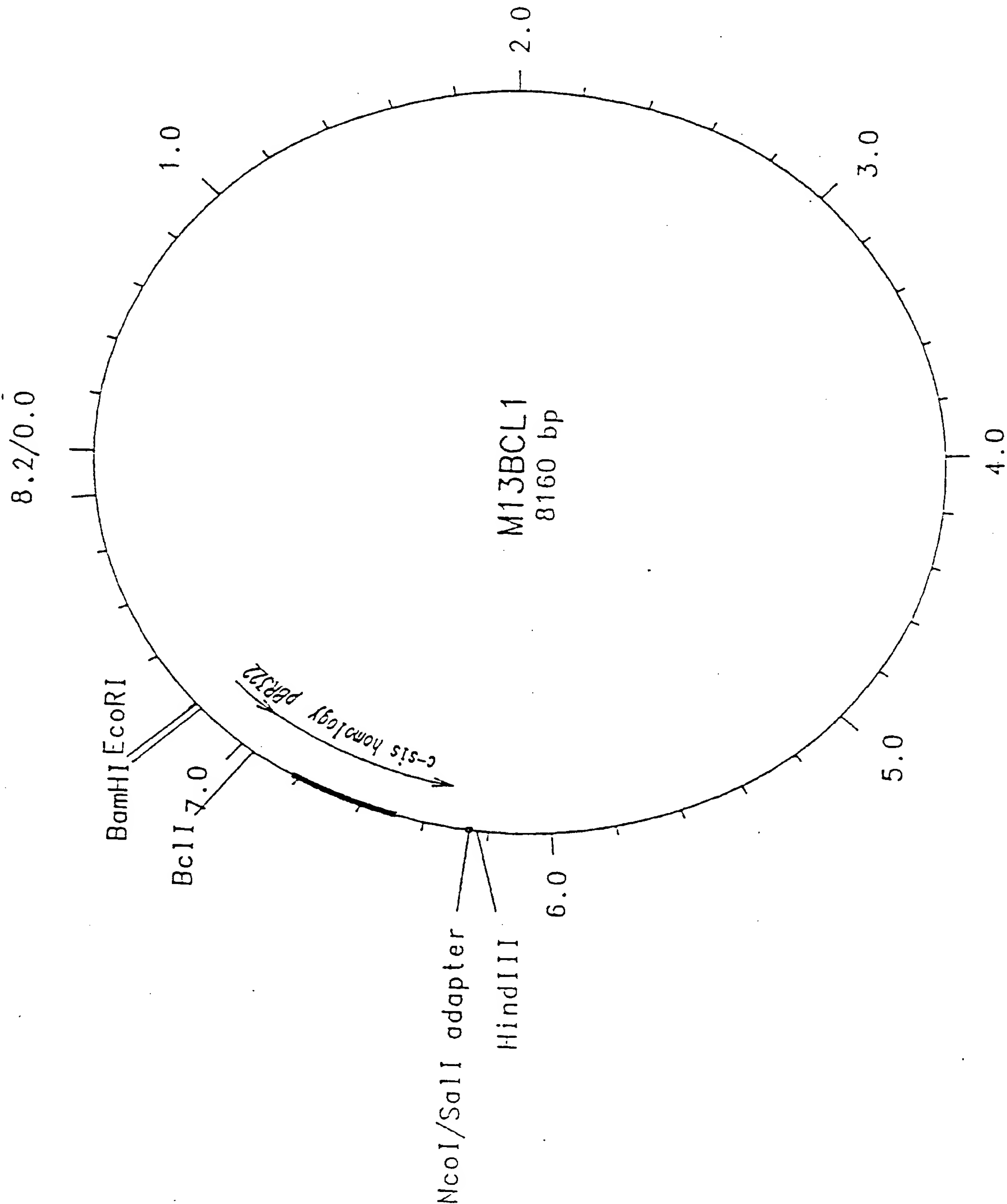


Figur 1b

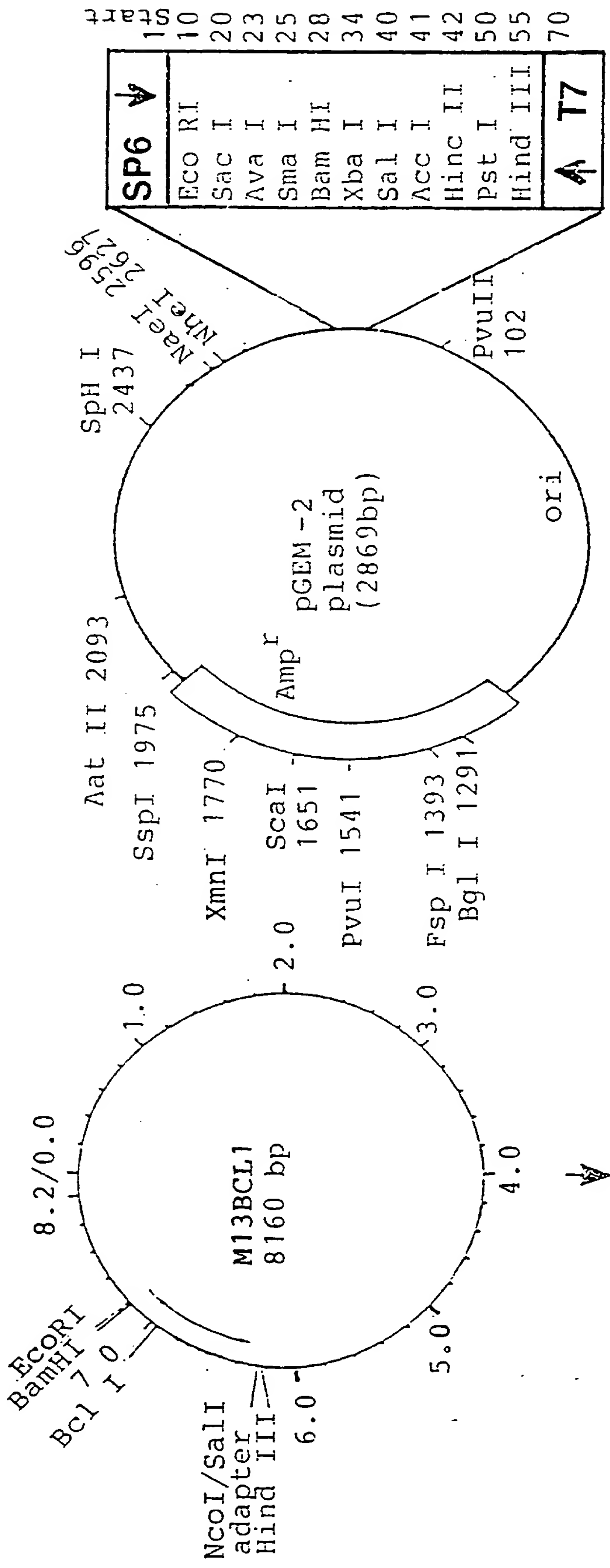


3/13

Figur 2



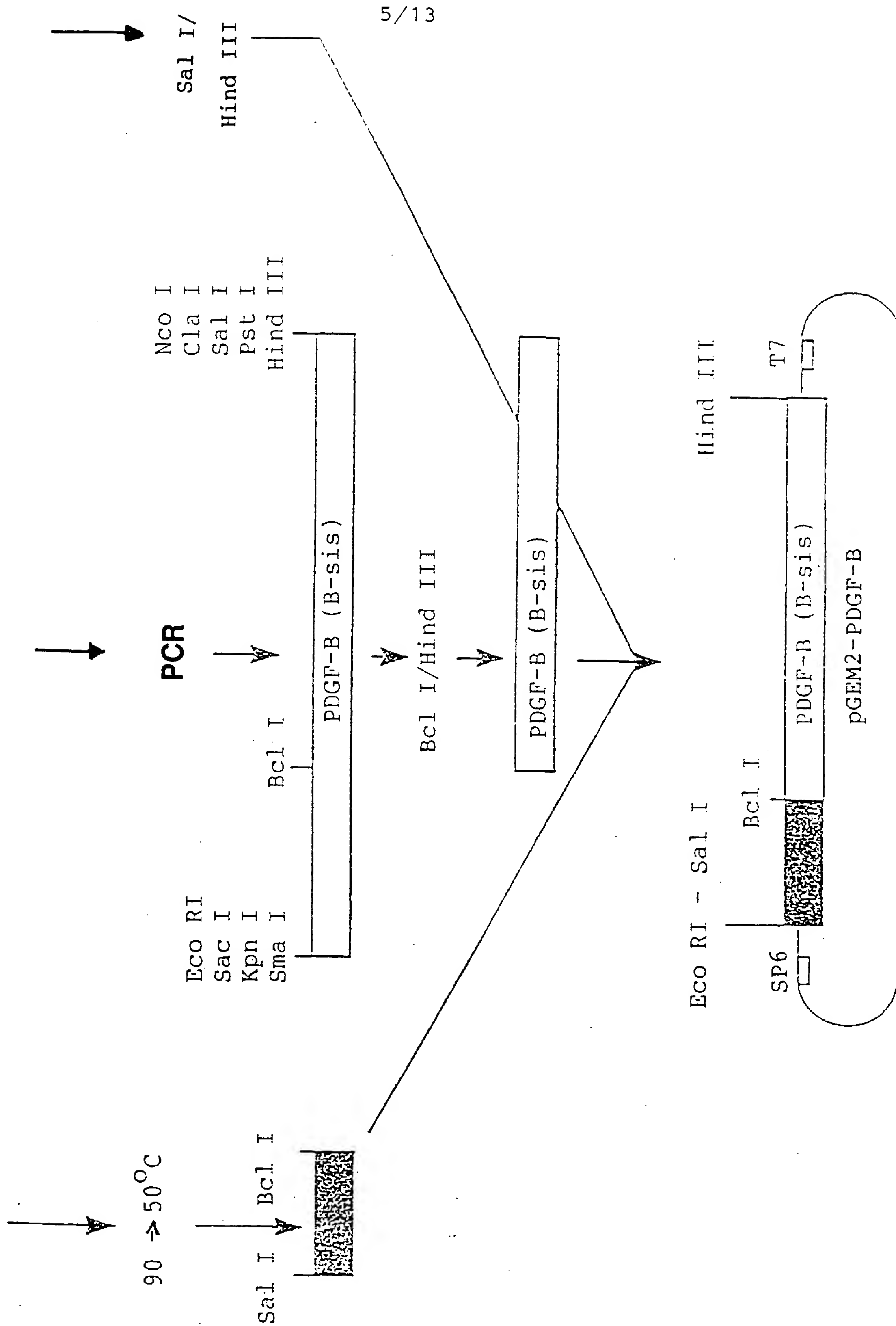
Figur 3a



(Fortsetzung
Figur 3b)

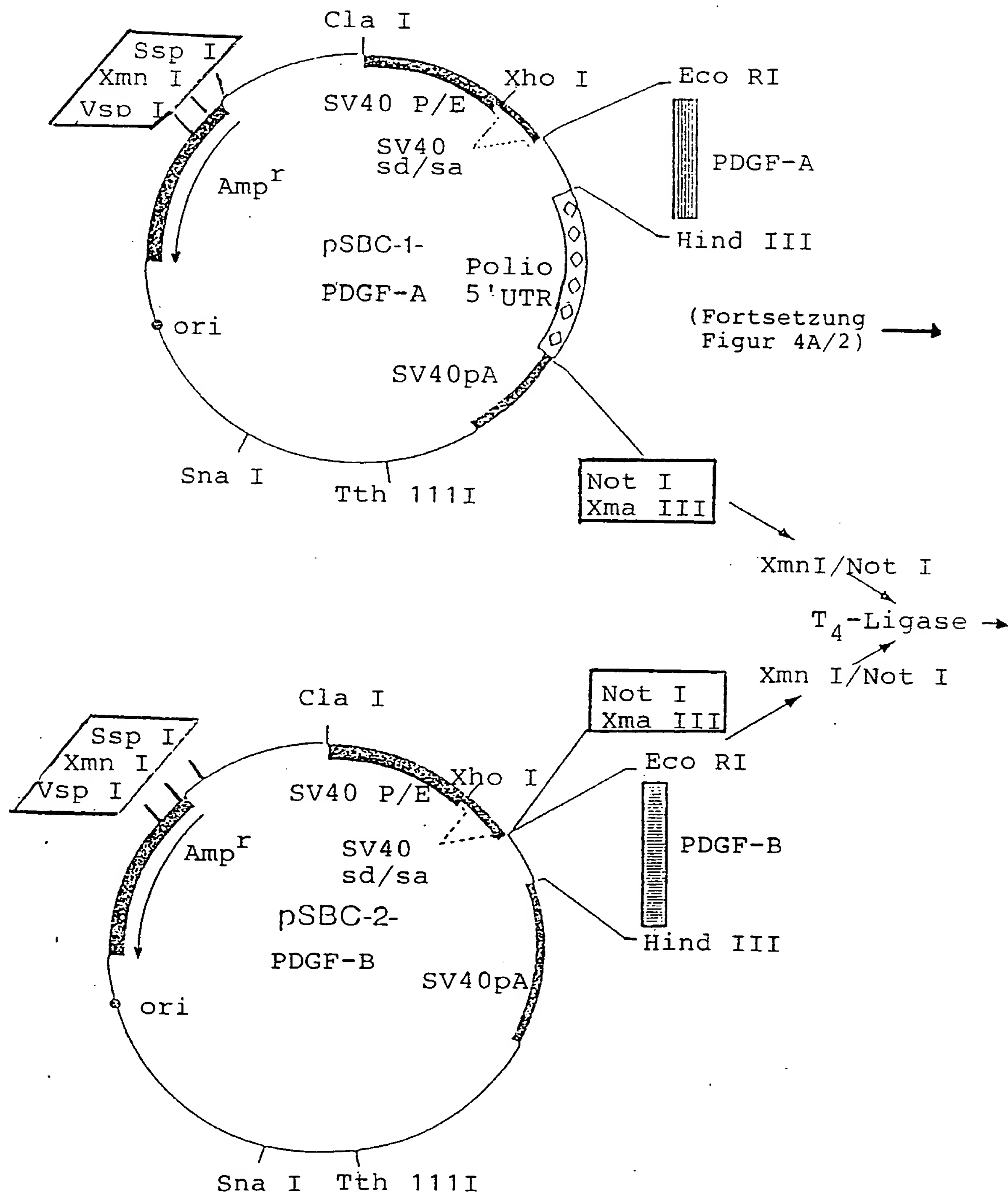
PPDGF-B1
PPDGF-B2

Figur 3b



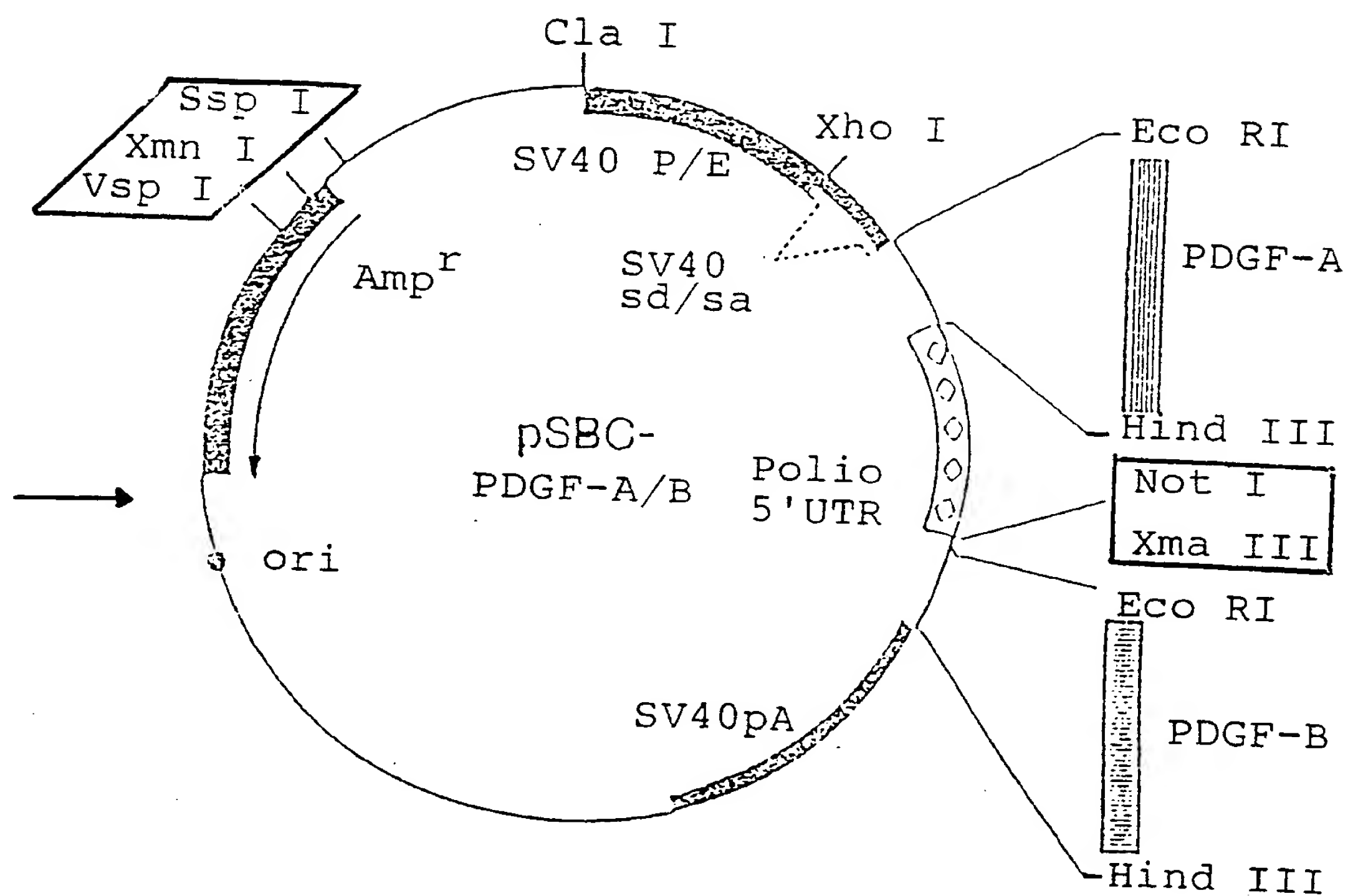
6/13

Figur 4A/1



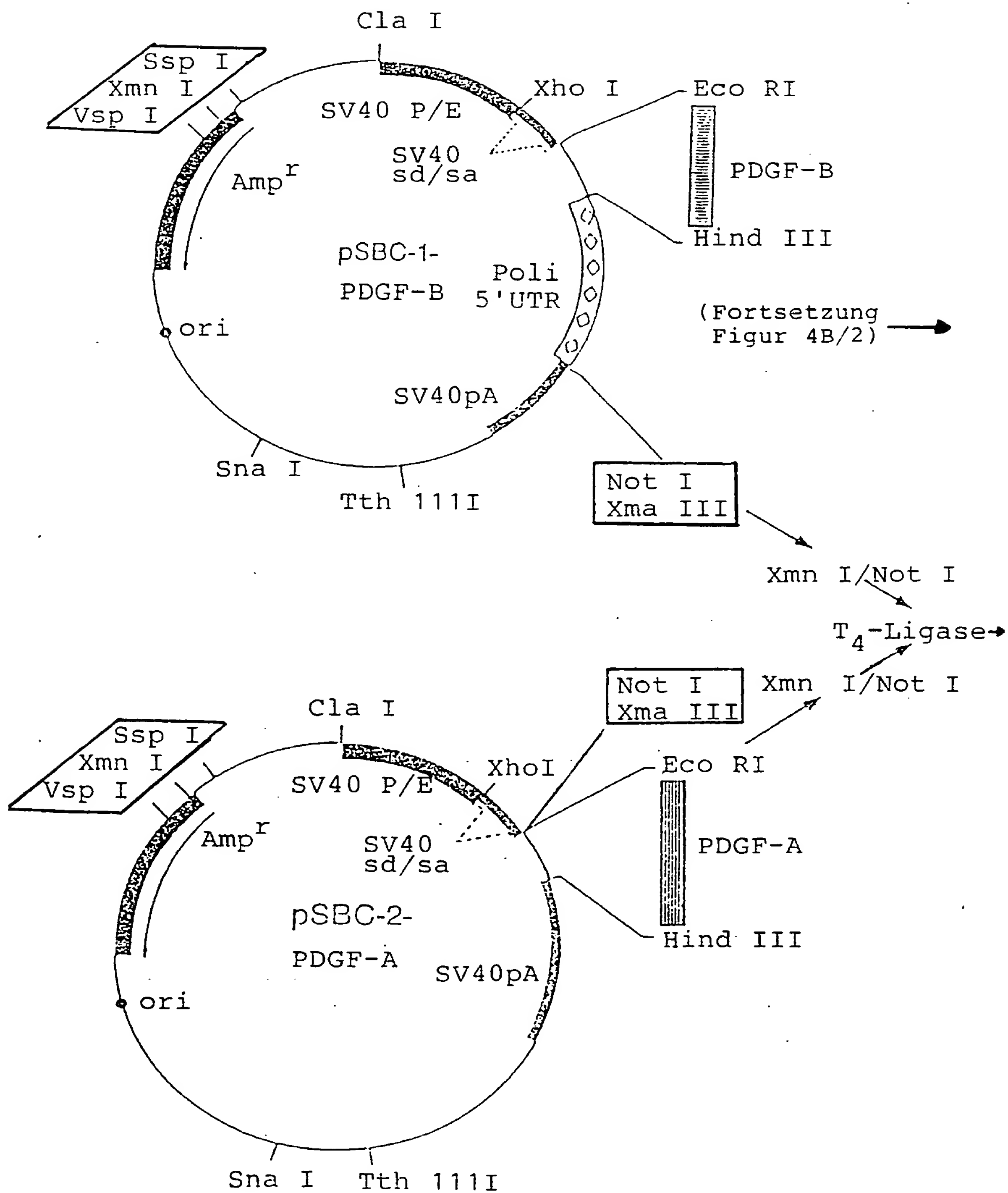
7/13

Figur 4A/2



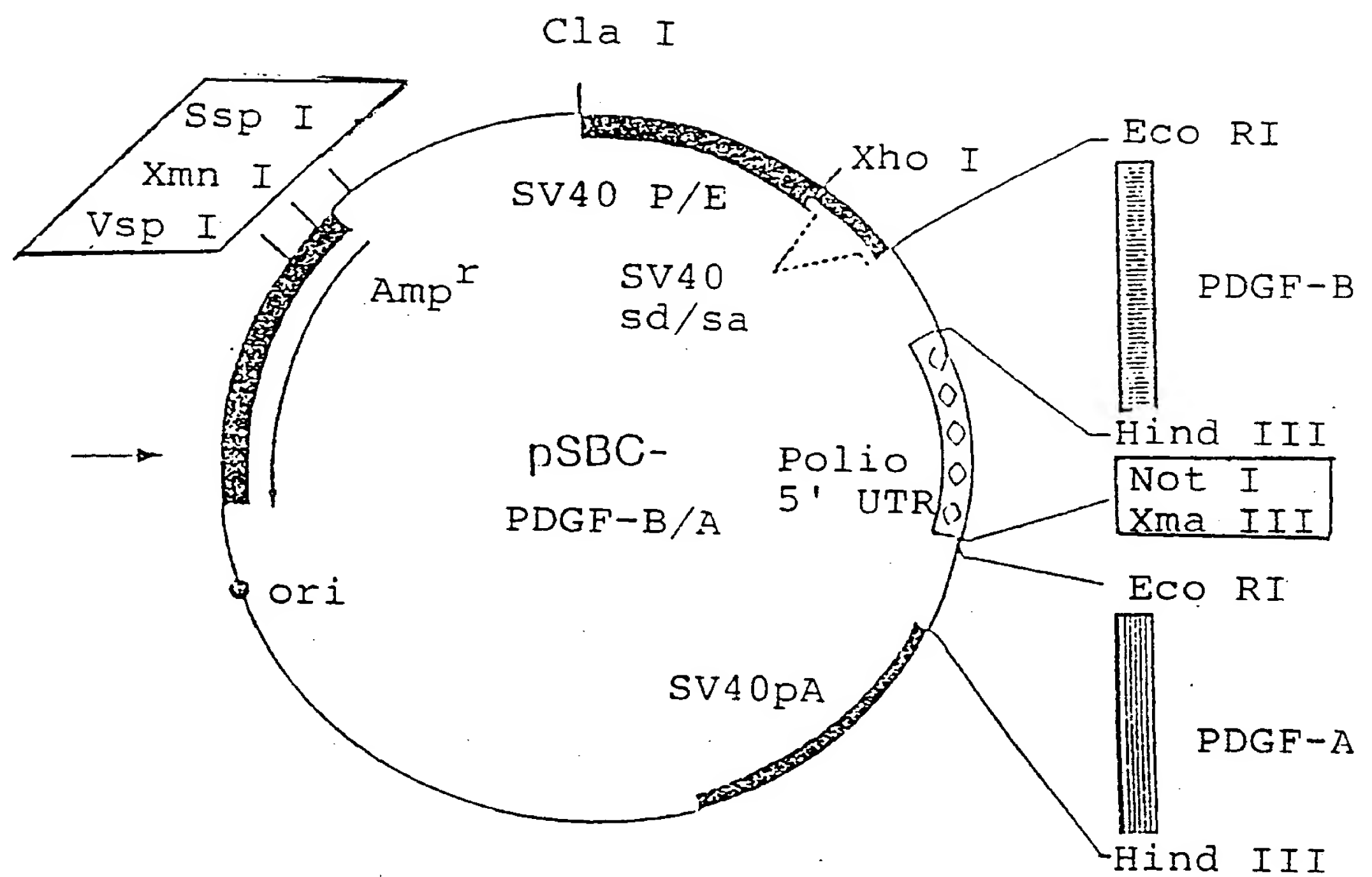
8/13

Figur 4B/1



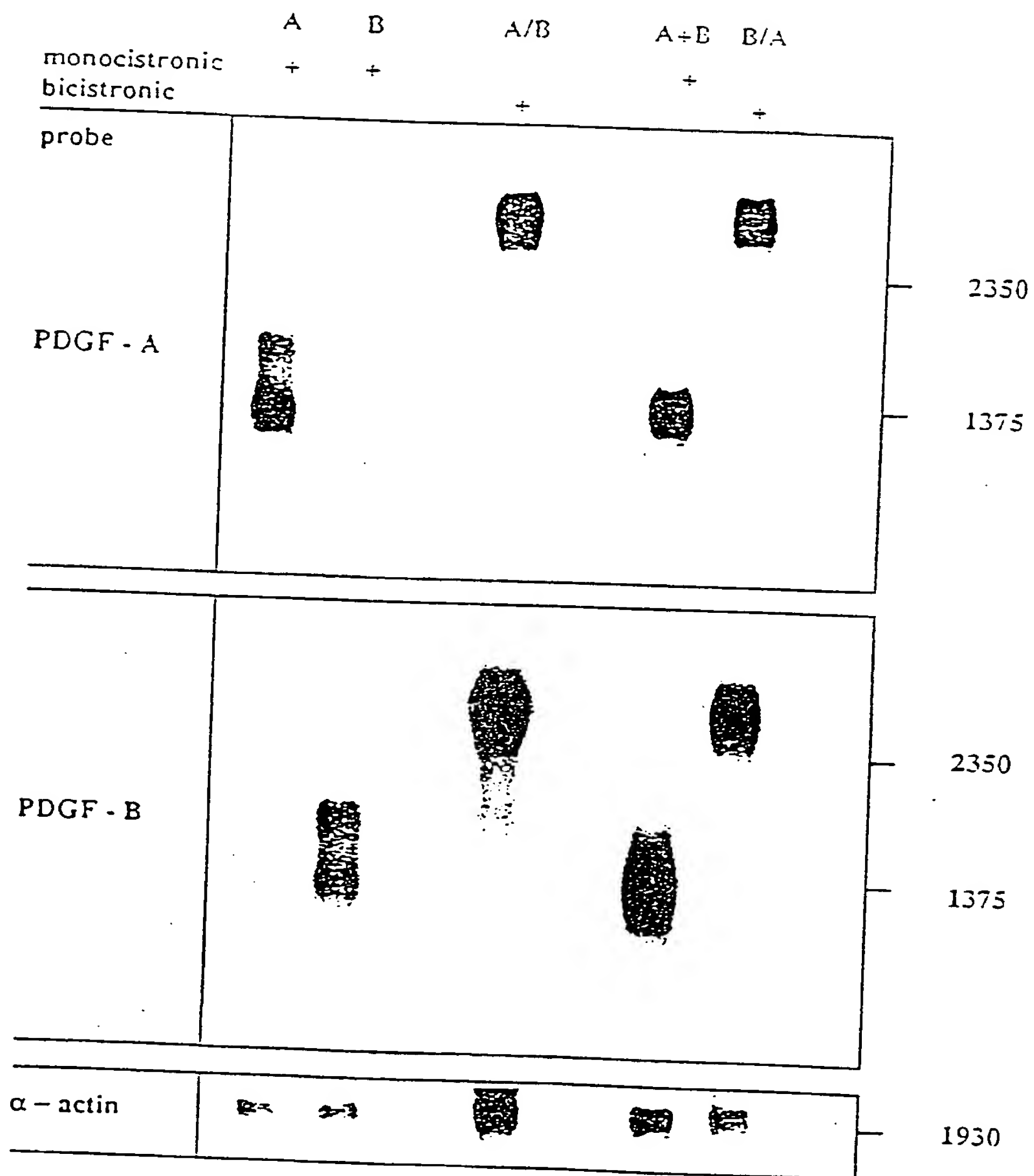
9/13

Figur 4B/2

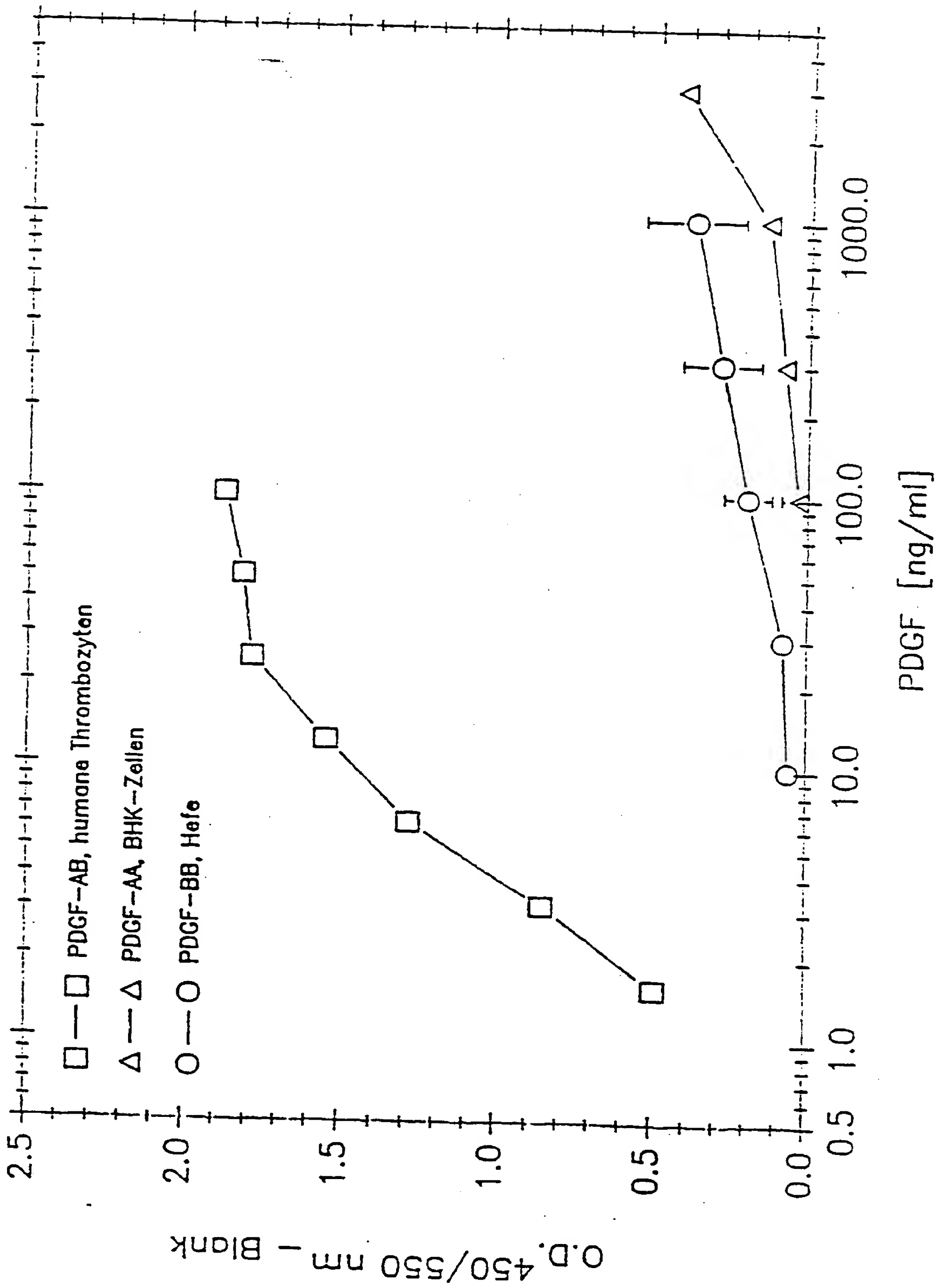


10/13

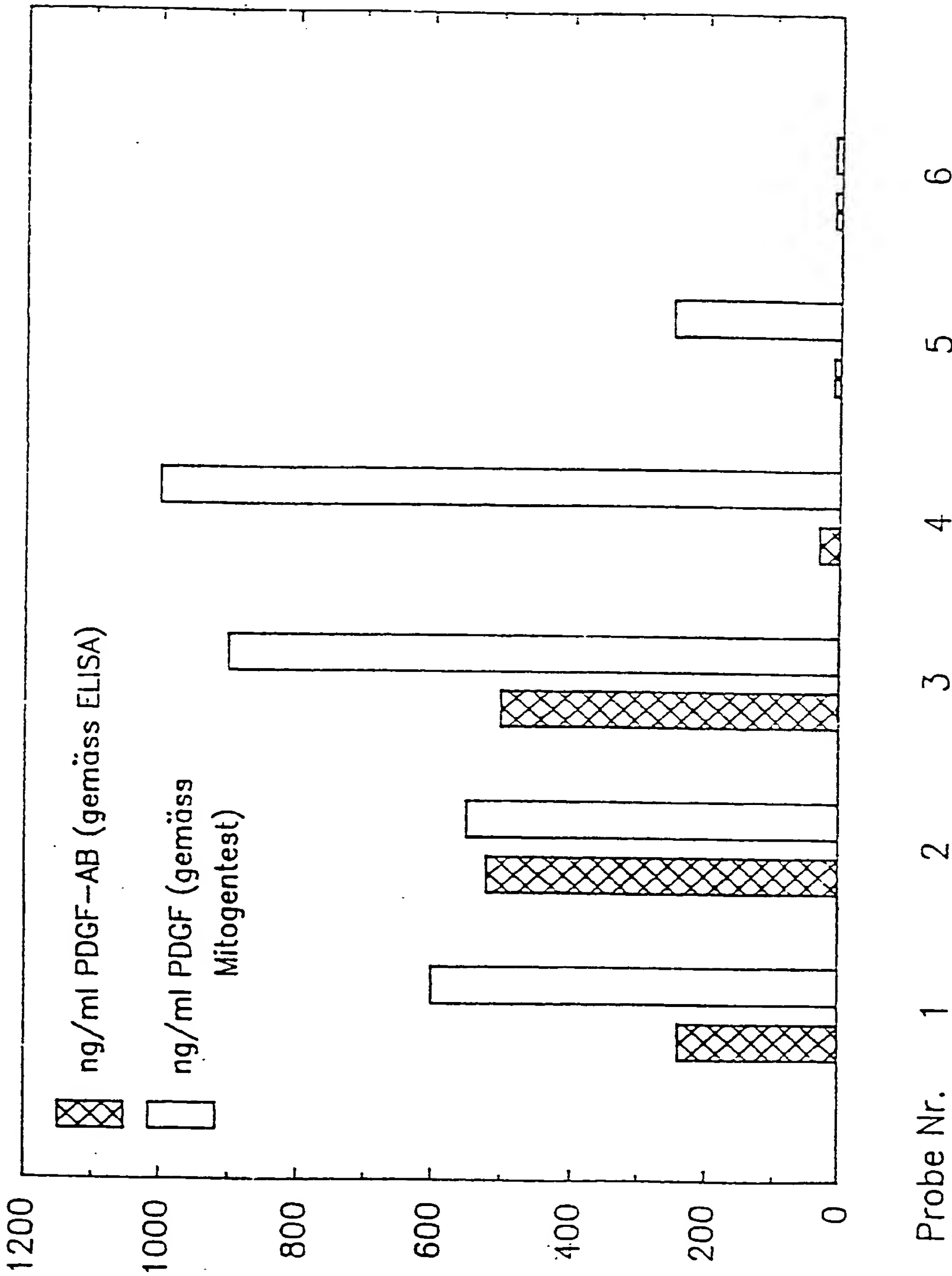
Figur 5



Figur 6
PDGF-AB-ELISA (B-spez. monokl. Antikörper + polykl. Anti-PDGF-AA):
Eichkurven von PDGF-Standards



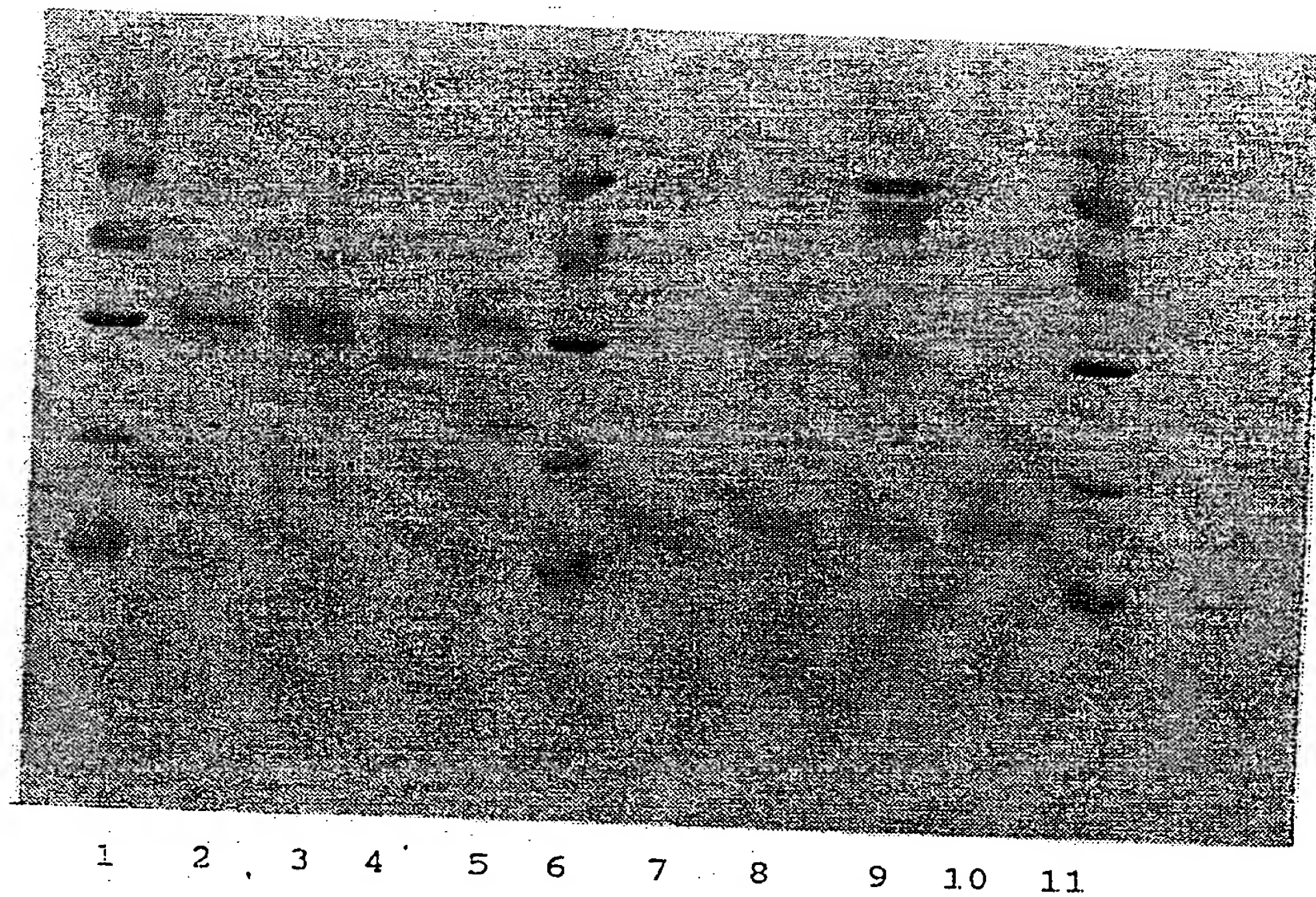
Figur 7
Kulturüberstände von rekomb. BHK-Zellen: Daten aus dem ELISA und
aus dem Mitogentest



13/13

Figur 8

--
Analyse von gereinigtem PDGF über SDS-PAGE



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
EP 93/02295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85 C07K13/00
A61K37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16 March 1988 cited in the application	13-18
Y	see page 12, line 29 - line 35; claims 1-36; figures 1-8 ---	1-4
X	J. BIOL. CHEM. vol. 263, no. 31, 5 November 1988, AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 16202 - 16208 A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer' cited in the application see page 16205, right column, line 12 - page 16207, right column, line 17; figure 1 --- -/--	13-15



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1993

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 93/02295

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22 February 1990 cited in the application see page 7, line 15 - page 8, line 10; claims 1-15 ---	1-4
A	WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26 July 1990 cited in the application insgesamt ---	13-18
A	EUR. J. BIOCHEM. vol. 185, no. 1, October 1989, SPRINGER VERLAG, BERLIN, BRD; pages 135 - 140 W. EICHNER ET AL. 'Large-scale preparation of recombinant platelet-derived growth factor AA secreted from recombinant baby hamster kidney cells' cited in the application insgesamt ---	13-15
P,Y	WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A., COUTURE, L.) 18 February 1993 see page 5, line 15 - page 9, line 17 -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
P 93/02295

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0259632	16-03-88	US-A- 4766073	23-08-88
		US-A- 4849407	18-07-89
		US-A- 4845075	04-07-89
		US-A- 4889919	26-12-89
		AU-A- 7681687	18-02-88
		AU-B- 641816	30-09-93
		AU-B- 8695791	19-03-91
		JP-A- 63119682	24-05-88
		US-A- 5128321	07-07-92
		US-A- 5187263	16-02-93
-----	-----	-----	-----
WO-A-9001550	22-02-90	AU-A- 4036389	05-03-90
		EP-A- 0426744	15-05-91
		JP-T- 4500004	09-01-92
-----	-----	-----	-----
WO-A-9008163	26-07-90	DE-A- 3900770	26-07-90
		AU-A- 4836790	13-08-90
		EP-A- 0453456	30-10-91
		JP-T- 4504407	06-08-92
-----	-----	-----	-----
WO-A-9303143	18-02-93	NONE	
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 93/02295

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85 C07K13/00
A61K37/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16. März 1988 in der Anmeldung erwähnt	13-18
Y	siehe Seite 12, Zeile 29 - Zeile 35; Ansprüche 1-36; Abbildungen 1-8 ---	1-4
X	J. BIOL. CHEM. Bd. 263, Nr. 31, 5. November 1988, AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; Seiten 16202 - 16208 A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 16205, rechte Spalte, Zeile 12 - Seite 16207, rechte Spalte, Zeile 17; Abbildung 1 --- -/-	13-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. November 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17-12-1993

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22. Februar 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile 10; Ansprüche 1-15 ---	1-4
A	WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26. Juli 1990 in der Anmeldung erwähnt insgesamt ---	13-18
A	EUR. J. BIOCHEM. Bd. 185, Nr. 1, Oktober 1989, SPRINGER VERLAG, BERLIN, BRD; Seiten 135 - 140 W. EICHNER ET AL. 'Large-scale preparation of recombinant platelet-derived growth factor AA secreted from recombinant baby hamster kidney cells' in der Anmeldung erwähnt insgesamt ---	13-15
P,Y	WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A., COUTURE, L.) 18. Februar 1993 siehe Seite 5, Zeile 15 - Seite 9, Zeile 17 -----	1-4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02295

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0259632	16-03-88	US-A- 4766073	23-08-88
		US-A- 4849407	18-07-89
		US-A- 4845075	04-07-89
		US-A- 4889919	26-12-89
		AU-A- 7681687	18-02-88
		AU-B- 641816	30-09-93
		AU-B- 8695791	19-03-91
		JP-A- 63119682	24-05-88
		US-A- 5128321	07-07-92
		US-A- 5187263	16-02-93
WO-A-9001550	22-02-90	AU-A- 4036389	05-03-90
		EP-A- 0426744	15-05-91
		JP-T- 4500004	09-01-92
WO-A-9008163	26-07-90	DE-A- 3900770	26-07-90
		AU-A- 4836790	13-08-90
		EP-A- 0453456	30-10-91
		JP-T- 4504407	06-08-92
WO-A-9303143	18-02-93	KEINE	